



日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office

出 願 年 月 日

Date of Application: 1999年12月27日

出 願 番 号

Application Number: 平成11年特許願第370035号

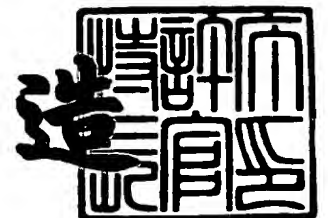
出 願 人

Applicant(s): 寶酒造株式会社

2001年 9月 3日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

及 川 耕 造



出証番号 出証特2001-3081278

【書類名】 特許願

【整理番号】 169297

【提出日】 平成11年12月27日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 C12N 15/10

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 向井 博之

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 山本 純子

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 武田 理

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 三宅 一恵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 萩屋 道雄

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 榎木 治久

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 浅田 起代蔵

【発明者】

【住所又は居所】 滋賀県大津市瀬田3丁目4番1号 寶酒造株式会社中央
研究所内

【氏名】 加藤 郁之進

【特許出願人】

【識別番号】 591038141

【住所又は居所】 京都府京都市伏見区竹中町609番地

【氏名又は名称】 寶酒造株式会社

【代理人】

【識別番号】 100062144

【弁理士】

【氏名又は名称】 青山 葆

【選任した代理人】

【識別番号】 100081422

【弁理士】

【氏名又は名称】 田中 光雄

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 013262

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9716279

【ブルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 核酸配列の増幅方法

【特許請求の範囲】

【請求項 1】 核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項 2】 (b) 工程と (c) 工程が連続的に反復される請求項 1 記載の方法。

【請求項 3】 少なくとも 2 種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライ

マー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(b)工程に再度利用される工程；

(d) (c)工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として(a)工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで該(a)工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの3'末端に配置されている工程；

(e) (d)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e)工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(e)工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項4】 各工程が等温で行われることを特徴とする請求項1～3のいずれか1項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項5】 鎖置換活性を有する1種のDNAポリメラーゼを使用して実施されることを特徴とする請求項1～4のいずれか1項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項6】 DNAポリメラーゼとして、大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが使用される請求項1～5のいずれか1項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 7】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項 1～6 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 8】 エンドリボヌクレアーゼが RNase H である請求項 7 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 9】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 1～8 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 10】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、1 以上の修飾リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項 1～9 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 11】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、リボヌクレオチドの α 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた (α -S) リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項 10 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 12】 トリシン、リン酸塩およびトリスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施されることを特徴とする請求項 1～11 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 13】 核酸配列を増幅するための方法であって、
(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程であって、該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである工程；および

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、
を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法。

【請求項 14】 反応混合物を等温でインキュベートすることを特徴とする

請求項 1 3 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 5】 さらに鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相同な配列を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有する反応混合物を使用することを特徴とする請求項 1 3 または 1 4 に記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 6】 DNA ポリメラーゼが、大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼからなる群から選択される DNA ポリメラーゼである請求項 1 3 ~ 1 5 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 7】 エンドヌクレアーゼがエンドリボヌクレアーゼである請求項 1 3 ~ 1 6 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 8】 エンドリボヌクレアーゼが R N a s e H である請求項 1 7 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 1 9】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 8 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 2 0】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、1 以上の修飾リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項 1 3 ~ 1 9 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 2 1】 キメラオリゴヌクレオチドプライマーが、リボヌクレオチドの α 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた (α -S) リボヌクレオチドを含有していることを特徴とする請求項 2 0 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 2 2】 トリシン、リン酸塩およびトリスから選択される緩衝成分を含有する緩衝液中で実施されることを特徴とする請求項 1 3 ~ 2 1 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 2 3】 鋳型となる核酸が一本鎖または二本鎖の DNA である請求項 1 ~ 2 2 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 24】 鋳型となる二本鎖 DNA を一本鎖 DNA にする工程の後に実施されることを特徴とする請求項 23 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 25】 鋳型となる核酸が RNA から逆転写反応によって得られた cDNA である請求項 23 または 24 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 26】 RNA を鋳型とした逆転写反応によって cDNA を合成する工程の後に実施されることを特徴とする請求項 25 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 27】 逆転写反应用プライマーがオリゴ dT プライマー、ランダムプライマーもしくは、特異的プライマーからなる群より選択されるプライマーである請求項 26 記載の核酸の増幅方法。

【請求項 28】 逆転写反应用プライマーがキメラオリゴヌクレオチドプライマーである請求項 26 または 27 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 29】 逆転写酵素として逆転写酵素活性を有する DNA ポリメラーゼを使用することを特徴とする請求項 26～28 いずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 30】 逆転写反応と鋳型に相補的な伸長鎖の合成とが、逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有する 1 種の DNA ポリメラーゼにより実施されることを特徴とする請求項 26～29 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 31】 DNA ポリメラーゼが、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bst DNA ポリメラーゼ、もしくは、バチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 Bca DNA ポリメラーゼであることを特徴とする請求項 28 記載の核酸配列の増幅方法。

【請求項 32】 請求項 1～31 いずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法に用いられるキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有し、当該リボヌクレオチドが該プライマーの 3' 末端に配置された構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 33】 連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有する請求項 32 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 34】 1 以上の修飾リボヌクレオチドを含有する請求項 32 または 33 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 35】 修飾リボヌクレオチドとして、リボヌクレオチド 3 リン酸の α 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた (α -S) リボヌクレオチドを含有することを特徴とする請求項 34 記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマー。

【請求項 36】 請求項 1～31 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法に使用される鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ。

【請求項 37】 請求項 1～31 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるエンドヌクレアーゼ。

【請求項 38】 請求項 1～31 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換反応における DNA ポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含むことを特徴とするキット。

【請求項 39】 請求項 36 記載の鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼおよび／または請求項 37 記載のエンドヌクレアーゼを含む、請求項 1～31 のいずれか 1 項記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキット。

【請求項 40】 パッケージされた形態において：

- (a) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ；
- (b) エンドヌクレアーゼ；及び
- (c) 鎖置換反应用緩衝液

をさらに含むことを特徴とする請求項 38 記載のキット。

【請求項 41】 DNA ポリメラーゼとして大腸菌由来の DNA ポリメラーゼ I のクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B s t DNA ポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の 5' → 3' エキソヌクレアーゼ欠損 B c a DNA ポリメラーゼからなる群から選択される DNA ポリメラーゼを含有する請求項 39 または 40 記載のキット。

【請求項 42】 エンドヌクレアーゼとして R N a s e H を含有する請求項

39 または 40 記載のキット。

【請求項 43】 試料中の標的核酸を検出するための方法であって、

(a) 請求項 1～31 記載の核酸配列の増幅方法により標的核酸を増幅する工程；および

(b) (a) 工程により増幅された標的核酸を検出する工程；
を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 44】 消光状態になるような距離で配置された 2 種類以上の蛍光物質で標識されたりボヌクレオチド (RNA) プローブによって増幅された標的核酸を検出することを特徴とする請求項 43 記載の核酸配列の検出方法。

【請求項 45】 請求項 43 または 44 記載の核酸配列の検出方法に使用される鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ。

【請求項 46】 請求項 43 または 44 記載の核酸配列の検出方法に使用されるエンドヌクレアーゼ。

【請求項 47】 請求項 43 または 44 記載の核酸配列の検出方法に使用されるキットであって、パッケージされた形態において、鎖置換反応における DNA ポリメラーゼ及びエンドヌクレアーゼの使用を指示した指示書を含むことを特徴とするキット。

【請求項 48】 請求項 45 記載の鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼおよび／または請求項 46 記載のエンドヌクレアーゼを含む、請求項 43 または 44 記載の核酸配列の検出方法に使用されるキット。

【請求項 49】 パッケージされた形態において：

- (a) 鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ；
- (b) エンドヌクレアーゼ；及び
- (c) 鎖置換反应用緩衝液

をさらに含むことを特徴とする請求項 47 記載のキット。

【請求項 50】 核酸固定化物を作製するための方法であって、

(a) 請求項 1～31 記載の核酸配列の増幅方法により固定化すべき核酸を増幅する工程；および、

(b) (a) 工程で増幅された核酸を担体上に固定化する工程；

を包含することを特徴とする核酸固定化物の作製方法。

【請求項 5 1】 実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸を増幅し、担体上に固定化することを特徴とする請求項 5 0 記載の核酸固定化物の作製方法。

【請求項 5 2】 請求項 5 0 または 5 1 記載の核酸固定化物の作製方法により作製された核酸固定化物。

【請求項 5 3】 一本鎖の核酸が固定化されていること特徴とする請求項 5 2 記載の核酸固定化物。

【請求項 5 4】 実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸が固定化されていること特徴とする請求項 5 3 記載の核酸固定化物。

【請求項 5 5】 試料中の標的核酸を検出するための方法であって、

- (a) 試料より標的核酸を含む可能性のある核酸試料を調製する工程；
- (b) 該核酸試料を請求項 5 2 ～ 5 4 のいずれか 1 項記載の核酸固定化物に接触させる工程；および、
- (c) 核酸固定化物中の核酸とハイブリダイズした該核酸試料中の標的核酸を検出する工程；

を包含することを特徴とする標的核酸の検出方法。

【請求項 5 6】 核酸配列を大量に製造する方法であって、

- (a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

- (b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

- (c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

【請求項 57】 少なくとも 2 種類のプライマーを使用し、核酸を大量に製造するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも 1 種類のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して該鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (c) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、ここで該 (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的で、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、該リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

【請求項 58】 核酸を大量に製造するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、および該プライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程であって、該プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、該リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーである工程；および

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、遺伝子工学分野において有用な DNA の合成方法に関し、鋳型となる核酸配列の増幅方法および該方法で増幅された核酸の検出方法に関する。

【0002】

【従来の技術】

遺伝子工学分野の研究において DNA の合成は種々の目的に使用される。このうちオリゴヌクレオチドのような短鎖の DNA の合成を除けば、そのほとんどは DNA ポリメラーゼを利用した酵素的方法により実施されている。例えば、ポリメラーゼ・チェイン・リアクション法 (PCR 法) があるが、それは米国特許第 4,683,195 号、第 4,683,202 号および第 4,800,159 号に詳細に記述されている。もう一つの例としては、トレンズ イン バイオテクノロジー (Trends in Biotechnology) 第 10 巻、146~152 頁 (1992) に記載の当該方法と逆転写酵素反応を組合わせた逆転写 PCR 法 (RT-PCR 法) が挙げられる。上記の方法の開発により、DNA から、若しくは RNA から目的とする領域を増幅することが可能になった。

【0003】

これらの DNA 合成方法は、目的とする DNA 領域を増幅させるために例えば

、二本鎖鋳型DNAの一本鎖への解離（変性）、一本鎖鋳型DNAへのプライマーのアニーリング、プライマーからの相補鎖合成（伸長）の3つのステップからなる反応により、もしくは、“シャトルPCR”（『PCR法最前線』、「蛋白質 核酸 酵素」別冊、第41巻、第5号、425頁～428頁（1996））と呼ばれる、前述の3ステップ反応のうちプライマーのアニーリングおよび伸長のステップを同一温度で行なう2ステップ反応により実施される。

【0004】

さらに別法としては、1989年6月14日に公開された欧州特許出願第320,308号に記述されているリガーゼ・チェイン・リアクション（LCR）法が挙げられる。上記3法は、次の増幅サイクルのための一本鎖標的分子を再生するために、高温から低温の反応を何回も繰り返す必要がある。このように温度によって反応が制約されるため、反応系は不連続な相またはサイクルで行なう必要がある。

【0005】

従って、上記の方法には広い温度範囲で、かつ、厳密な温度調整を経時的に行なうことのできる高価なサーマルサイクラーを使用することが必要となる。また、該反応は、2種類～3種類の温度条件で行なうため設定温度にするために要する時間が必要であり、そのロス時間はサイクル数に比例して増大していく。

【0006】

そこで、上記問題点を解決すべく等温状態で実施可能な核酸増幅法が開発された。例えば、特公平7-114718号に記載の鎖置換型増幅（SDA；strand displacement amplification）法、自立複製（3SR；self-sustained sequence replication）法、日本国特許番号第2650159号に記載の核酸配列増幅（NASBA；nucleic acid sequence based amplification）法、TMA（transcription-mediated amplification）法、日本国特許番号第2710159号に記載のQベータレプリカーゼ法、さらに米国特許番号第5,824,517号、国際公開パンフレット第99/09211号、国際公開パンフレット第95/25180号あるいは、国際公開第99/49081号等に記載の種々の改良SDA法が挙げられる。米国特許番号第5,916,777号には等温状態でのオ

リゴヌクレオチドの酵素的合成方法が記載されている。これらの等温核酸増幅法またはオリゴヌクレオチド合成法の反応においては、プライマーの伸長や、一本鎖伸長生成物（または元の標的配列）へのプライマーのアニールリングや、それに続くプライマーの伸長は、一定温度で保温された反応混合物中で同時に起こる。

【0007】

これらの等温核酸増幅法のうち最終的にDNAが増幅される系、例えば、SDA法は、DNAポリメラーゼと制限エンドヌクレアーゼを介する二本鎖の置換による、試料中の標的核酸配列（およびその相補鎖）の増幅法であるが、該方法では、増幅に使用するプライマーは4種類必要であり、その内の2種類は、制限エンドヌクレアーゼの認識部位を含むように構築する必要がある。また、該方法では、DNA合成のための基質として、修飾されたデオキシリボヌクレオチド3リン酸、例えば α 位のリン酸基の酸素原子が硫黄原子（S）に置換された（ α -S）デオキシリボヌクレオチド3リン酸を大量に用いる必要があり、ルーチンワークで反応を行なう遺伝子検査等においては、そのランニングコストが深刻な問題となってくる。さらに該方法では、増幅されたDNA断片中に上記の修飾ヌクレオチド、たとえば（ α -S）デオキシリボヌクレオチドが含まれるため、例えば、増幅後のDNA断片を制限酵素長多型（RFLP；restriction enzyme fragment length polymorphism）解析に供しようとする場合に、該断片が制限酵素で切断できないことがある。

【0008】

また、米国特許番号第5, 824, 517号記載の改良SDA法は、RNAとDNAから構成され、3'末端側がDNAである構造を有するキメラプライマーを必要とする。また、国際公開パンフレット第99/09211号に記載の改良SDA法は、5'突出末端を生じさせる制限酵素が必要である。また、国際公開パンフレット第95/25180号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマー対を必要とする。さらに、国際公開パンフレット第99/49081号に記載の改良SDA法は、少なくとも2組のプライマーと少なくとも1種類の修飾デオキシリボヌクレオチド3リン酸を必要とする。一方、米国特許番号第5, 916, 777号は、オリゴヌクレオチドを合成するために、3'末端にリボ

ヌクレオチドを有するプライマーを使用してDNAを合成し、反応終了後にエンドヌクレアーゼによりプライマー伸長鎖中のプライマーと伸長鎖の間にニックをいれて分離させ、テンプレートを消化し、さらにプライマーを回収して再利用するというものである。該方法では、プライマーを再利用する際には反応系よりプライマーを単離したうえで鋳型を再度アニーリングさせる必要がある。

【0009】

上記のように従来の等温核酸増幅法はまだまだ種々の問題をかかえており、低ランニングコストで、かつ結果的に得られたDNA断片をさらに遺伝子工学的な処理に使用することが可能な核酸配列の増幅方法が求められていた。

【0010】

【発明が解決しようとする課題】

本発明の目的は、オリゴヌクレオチドプライマーの存在下にDNA合成反応を行なうことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法を提供することにある。

【0011】

【課題を解決するための手段】

本発明者らは鋭意研究の結果、好適には、エンドリボヌクレアーゼにより3'末端側が切断され得るプライマー、エンドリボヌクレアーゼ、およびDNAポリメラーゼの存在下に目的とする領域のDNAを増幅する方法を見出し、優れた遺伝子増幅反応系を構築し、本発明を完成するに至った。該方法は、等温条件下、キメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いる核酸配列の増幅 (Isothermally chimeric primer used amplification of nucleic acid) 法であり、以下、ICAN法と称す。

【0012】

本発明の第1の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマ

ーであって、このリボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されている工程；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

【0013】

本発明の第2の発明は、少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、このリボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されている工程；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(b)工程に再度利用される工程；

(d) (c)工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として(a)工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで(a)工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、当該リボヌクレオチドはエン

ドヌクレアーゼによる切断ために該プライマーの3'末端に配置されている工程；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が(e)工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

【0014】

本発明の第1および第2の発明は、等温で行うことができ、また鋳型となる核酸配列がDNA配列であってもよい。さらに、第1および第2の発明の(a)工程の前にRNAを鋳型として、逆転写酵素による逆転写反応により一本鎖のcDNAを調製する工程を含み、該一本鎖のcDNAを鋳型となる核酸配列とすることもできる。また、本発明の第1および第2の発明において、鋳型となるDNAは一本鎖、二本鎖のいずれもが好適に使用できる。二本鎖DNAが鋳型となる場合は、二本鎖DNAを一本鎖に変性する前処理工程の後に本発明の方法を行えばよい。

【0015】

上記発明において、プライマーからの伸長は鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより行われることを特徴とする。即ち、本発明には大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのクレノウ断片、バチルス ステアロサーモフィラス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bst DNAポリメラーゼ、およびバチルス カルドテナックス由来の5'→3'エキソヌクレアーゼ欠損Bca DNAポリメラーゼからなる群から選択されるDNAポリメラーゼが好適に使用できる。また、エンドヌクレアーゼは、エンドリボヌクレアーゼが好適に使用でき、特に限定するものではないが、例えばRNase Hが使用できる。

【0016】

本発明の第3の発明は、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、およびこのプライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製する工程であって、上記プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの 3' 末端に配置されたキメラオリゴヌクレオチドである工程；および

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法に関する。

上記第 3 の発明において、鋳型となる核酸配列は、一本鎖 DNA、一本鎖 DNA に変性された二本鎖 DNA、または RNA から逆転写反応によって得られた cDNA からなる群より選択される核酸配列であることができる。また、上記反応混合物中に 2 種以上のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを含有してもよい。本発明に使用される鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼには、上記の第 1、第 2 の発明に使用されるものが好適に使用できる。

【0017】

本発明の第 1～第 3 の発明に使用されるプライマーは、オリゴリボヌクレオチドプライマーあるいはオリゴデオキシリボヌクレオチドプライマーであってもよく、また、キメラオリゴヌクレオチドプライマーであってもよい。さらに、本発明の方法において上記 3 種類のプライマーを組み合わせて使用してもよい。例えば、本発明にはデオキシリボヌクレオチドの 3' 末端側に少なくとも 1 残基、好ましくは連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドが結合した構造を有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いることができる。さらに、1 以上の修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー、例えばリボヌクレオチドの α 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた (α -S) リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーが好適に使用できる。

【0018】

本発明の第 4 の発明は、上記の第 1 ～第 3 の発明に使用できるキメラオリゴヌクレオチドプライマーに関する。このプライマーは、デオキシリボヌクレオチドとリボヌクレオチドを含有し、プライマーの 3' 末端側にリボヌクレオチドが配置されていることを特徴とする。例えば、少なくとも 1 残基、好ましくは連続した 2 残基以上のリボヌクレオチドを含有し、その 3' 末端より DNA 鎖の伸長が可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレアーゼ、例えば RNase H の作用により上記リボヌクレオチド残基の 3' 末端側が切断されるよう設計されたキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。さらに、1 以上の修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマー、例えばリボヌクレオチドの α 位のリン原子に結合している酸素原子を硫黄原子に置き換えた (α -S) リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーが挙げられる。

【 0 0 1 9 】

本発明の第 5 の発明は、上記第 1 ～第 3 の発明に使用される鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼおよびそれらを含むキットに関する。

【 0 0 2 0 】

本発明の第 6 の発明は、標的核酸を検出するための方法であって、本発明の第 1 ～ 3 の発明の核酸配列の増幅方法により標的核酸を増幅した後、この核酸を検出する工程を包含することを特徴とする。検出方法には、消光状態になるような距離で配置された 2 種類以上の蛍光色素で標識されたりボヌクレオチド (RNA) プローブによって標的核酸を検出する方法が包含される。

【 0 0 2 1 】

本発明の第 7 の発明は、本発明の第 6 の発明の標的核酸の検出方法に使用される鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼおよびそれらを含むキットに関する。

【 0 0 2 2 】

本発明の第 8 の発明は、核酸固定化物を作製するための方法に関し、本発明の第 1 ～ 3 の発明の核酸配列の増幅方法により増幅された核酸を担体上に固定化す

る工程を包含することを特徴とする。特に好適には、実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸を増幅、固定化する方法が挙げられる。

【0023】

本発明の第9の発明は、核酸固定化物に関し、本発明の第8の発明の方法によって作製されたものであることを特徴とする。特に好適には、実質的にその相補鎖を含まない一本鎖の核酸が固定化されたものが挙げられる。

【0024】

本発明の第10の発明は、試料中の標的核酸を検出するための方法に関し、本発明の第9の発明の核酸固定化物を使用し、この核酸固定化物上に固定化された核酸にハイブリダイズした核酸を検出することを特徴とする。

【0025】

本発明の第11の発明は核酸を大量に製造する方法であって、

(a) 鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

【0026】

本発明の第12の発明は、少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸を大量に製造する方法であって、

(a) 鋳型となる核酸をこの核酸の塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライ

マー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (c) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成し、ここで (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

【0027】

本発明の第 13 の発明は核酸を大量に製造する方法であって、

(a) 鋳型となる核酸、デオキシリボヌクレオチド 3 リン酸、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼ、少なくとも 1 種類のプライマー、およびこのプライマーより生成する伸長鎖を切断するエンドヌクレアーゼを混合して反応混合物を調製

する工程であって、上記プライマーは、鋳型となる核酸の塩基配列に実質的に相補的であり、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有し、リボヌクレオチドがエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されたキメラオリゴヌクレオチドである工程；および

(b) 反応産物を生成するのに十分な時間、反応混合物をインキュベートする工程、

を包含することを特徴とする核酸の製造方法に関する。

【0028】

【発明の実施の形態】

以下、本発明を詳細に説明する。

(1) 本発明に使用するキメラオリゴヌクレオチドプライマー

本明細書に記載のデオキシリボヌクレオチド（本明細書中ではdNとも記載する）とは、糖部分がD-2-デオキシリボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、例えば、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、チミンを有するものが挙げられる。

【0029】

本明細書に記載のリボヌクレオチド（本明細書中ではNとも記載する）とは、糖部分がD-リボースで構成されたヌクレオチドのことをいい、塩基部分にアデニン、シトシン、グアニン、ウラシルを有するものが挙げられる。さらに、当該リボヌクレオチドには修飾リボヌクレオチド、特に限定するものではないが、例えば α 位のリン酸基の酸素原子を硫黄原子に置き換えたリボヌクレオチド〔（ α -S）リボヌクレオチド、（ α -S）Nとも記載する〕やその他の誘導体等も含まれる。

【0030】

本発明の方法において使用されるプライマーは、デオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。該プライマーには未修飾リボヌクレオチドおよび／または修飾リボヌクレオチドを含有するオリゴリボヌクレオチドプライマーも含まれる。

【0031】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鋳型核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な塩基配列を有し、その3'末端よりDNA鎖の伸長が可能であり、さらに、DNA合成反応中にエンドヌクレアーゼにより切断される部位をその3'末端部分に有するものであれば良い。当該プライマーは通常、増幅しようとする領域の上流、すなわち鋳型核酸上の増幅しようとする領域に対応する塩基配列の3'側部分に相補的に設計される。なお、ここで「実質的に相補的な塩基配列」とは、使用される反応条件において鋳型となるDNAにアニーリング可能な塩基配列を意味する。このようなキメラオリゴヌクレオチドプライマーあるいはオリゴヌクレオチドプライマーの設計は当業者に公知であり、例えば、ラボマニユアルPCR（宝酒造社発行、第13頁～第16頁、1996年）を参考に設計することができる。また、市販のプライマー設計ソフト、例えば、OLIGOTM Primer Analysis software（宝酒造社製）を使用することができる。

【0032】

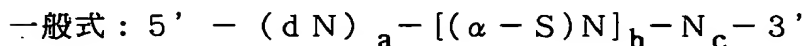
本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは1以上の修飾リボヌクレオチドを含有するものであってもよい。このような修飾リボヌクレオチドとしては、特に限定するものではないが、たとえば、リン酸基に結合する酸素原子が硫黄原子に置換された（ α -S）リボヌクレオチドや、リボースの2位の水酸基がメトキシ基に置換されたりボヌクレオチドが挙げられる。このような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、例えば、米国特許第5,003,097号記載の硫化反応試薬（グレンリサーチ社製）を用いた方法で調製した（ α -S）リボヌクレオチド3リン酸、あるいは2-OMe-RNA-CE ホスホアミダイド試薬（グレンリサーチ社製）を用いて作製することができる。

【0033】

エンドヌクレアーゼによる切断に耐性を付与するような修飾リボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅反応工程におけるエンドヌクレアーゼの切断位置を固定する観点から有用である。

【0034】

本発明を何ら限定するものではないが、例えば、下記一般式で表す構造をもつオリゴヌクレオチドが本発明のDNA合成方法に使用することができる。



(a: 1以上以上の整数、b: 0または1以上の整数、c: 0または1以上の整数、ただし、b = c = 0の場合を除く、dN: デオキシリボヌクレオチド、(α - S)N: α -チオオリボヌクレオチド、N: リボヌクレオチド)

例えば、上記一般式において、b = 1、c = 1のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b = 2、c = 2のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b = 0、c = 1のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、b = 0、c = 2のキメラオリゴヌクレオチドプライマー、さらにb = 0、c = 3のキメラオリゴヌクレオチドプライマー等が本発明に好適に使用できる。

【0035】

本発明に使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、鎖置換（ストランドディスプレイスメント、strand displacement）反応が起こるように、該プライマーよりDNAポリメラーゼで伸長されたDNA鎖（プライマー伸長鎖）中の、該プライマーの3'末端部分で切断されるような構造を有している。すなわち、上記のキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、エンドヌクレアーゼにより切断を受けるようなリボヌクレオチドがその3'末端部分に配置されている。例えば、鋳型核酸にアニーリングした、上記の一般式で表されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAにRNase Hを作用させた場合には、上記キメラオリゴヌクレオチドプライマーのリボヌクレオチド部分のみが切断され、上記オリゴヌクレオチドプライマーと伸長により合成されたDNA鎖の間にニックの入った二本鎖DNAが生じる。RNase Hは上記リボヌクレオチドの3'側を切断することから、当該切断反応によって切断されたプライマー伸長鎖のプライマー側断片の3'末端にはリボヌクレオチドが残る。

【0036】

本発明の方法で使用するオリゴヌクレオチドプライマーは、増幅後のDNA断片を一本鎖もしくは二本鎖のいずれの形態で得たいかによって1種類もしくは2

種類を使い分けることができる。すなわち、一本鎖DNAが望まれる場合には1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを、また、二本鎖が望まれる場合には2種類のプライマーが使用される。

【0037】

本発明の方法において使用されるキメラオリゴヌクレオチドプライマーは約12ヌクレオチドから約100ヌクレオチドの長さのが好ましい。さらに好ましくは、約15ヌクレオチドから約40ヌクレオチドの長さのプライマーである。その塩基配列は使用される反応条件において鋳型核酸にアニーリングするように、実質的に鋳型核酸に相補的な配列であることが好ましい。該プライマーには、後に示す段階で使用されるエンドヌクレアーゼにより認識される配列を3'末端付近に含む。

【0038】

これらのキメラオリゴヌクレオチドプライマーは、任意の核酸配列を持つように、例えばアプライド・バイオシステムズ社（ABI社、Applied Biosystem Inc.）のDNAシンセサイザー394型を用いて、ホスホアミダイト法により合成できる。また、別法としてリン酸トリエステル法、H-ホスホネート法、チオホスホネート法等があるが、いかなる方法で合成されたものであっても良い。

【0039】

(2) 本発明に使用されるエンドヌクレアーゼ

本発明に使用されるエンドヌクレアーゼとは、鋳型核酸にアニーリングした、上記(1)に記載のキメラオリゴヌクレオチドプライマーよりDNAの伸長を行って生成した二本鎖DNAに作用して、該プライマーのリボヌクレオチド部分の3'末端側を特異的に切断するものであればよい。即ち、上記の二本鎖DNAのうちのキメラオリゴヌクレオチドプライマー部分にニックを生成する酵素である。特に限定されるものではないが、例えば、本発明にはリボヌクレアーゼが使用でき、特にDNAとRNAとから形成された二本鎖核酸のRNA部分に作用するエンドリボヌクレアーゼH（RNase H）が好適に使用できる。また、該リボヌクレアーゼには、上記作用を有するものであれば、常温性リボヌクレアーゼ、中温性リボヌクレアーゼ、および耐熱性リボヌクレアーゼのいずれもが好適に本

発明に使用できる。例えば、下記実施例に示すように、55℃での反応では大腸菌 (*E. coli*) 由来の RNase H を本発明の方法に使用することができ、また、耐熱性リボヌクレアーゼとしては市販の HybridaseTM Thermostable RNase H (エピセンターテクノロジーズ社製) 等も好適に使用できる。さらに、該リボヌクレアーゼは、天然体および変異体のいずれでも良い。なお、本願明細書に記載されている RNase H の酵素単位は、実施例中の参考例に示した酵素単位測定方法に基づいて表示された数値である。

【0040】

本明細書において使用されている「ニックを入れる」もしくは「ニッキング」という語は、二本鎖核酸の一方の鎖の内部を切断することを意味する。たとえば、RNase H は DNA とリボヌクレオチドを含む DNA とのハイブリッド二本鎖核酸に作用し、二本鎖のうちのリボヌクレオチドを含む鎖のリボヌクレオチド部分を選択的に切断することにより、当該ハイブリッド二本鎖核酸にニックを入れる。

【0041】

また、本発明の方法に使用するエンドヌクレアーゼ、例えば、RNase H の切断反応の効率は上記プライマーの 3' 末端近傍の塩基配列に左右され、所望の DNA の増幅効率に影響することが考えられるので、使用する RNase H に最適なプライマーをデザインすることは当然のことである。

【0042】

(3) 本発明に使用される DNA ポリメラーゼ

本発明に使用される DNA ポリメラーゼは、DNA の鎖置換 (strand displacement) 活性を有するものを使用することができる。また、実質的に 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を有しないものが特に好適に使用することができる。特に限定するものではないが、例えば、バチルス・カルドテナックス (*Bacillus caldotenax*、以下、*B. ca* と称す) やバチルス・ステアロサーモフィルス (*Bacillus stearothermophilus*、以下 *B. st* と称す) 等の好熱性バチルス属細菌由来 DNA ポリメラーゼの 5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠失した変異体や、大腸菌 (以下、*E. coli* と称す) 由来の DNA ポリメラーゼ I のラージ

フラグメント（クレノウ断片）等が挙げられる。また、本発明に使用できるDNAポリメラーゼは、常温性、中温性、もしくは耐熱性のいずれのものも好適に使用できる。

【0043】

B. c a は生育至適温度が約 70℃である好熱性細菌であり、この細菌由来の B c a DNAポリメラーゼは、DNA依存DNAポリメラーゼ活性、RNA依存DNAポリメラーゼ活性（逆転写活性）、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性、3' → 5' エキソヌクレアーゼ活性を持つことが知られている。

【0044】

上記の酵素はその本来の起源より精製して取得されたもの、あるいは遺伝子工学的に生産された組み換え蛋白質の何れであっても良い。また、該酵素は、遺伝子工学的あるいはその他の手法によって置換、欠失、付加、挿入等の改変を加えたものであっても良く、このような酵素の例として、5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損させた B c a DNAポリメラーゼである B c a B E S T DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）等が挙げられる。

【0045】

（4）本発明に使用される反応バッファーの組成

本発明に使用される反応バッファーには、緩衝成分、マグネシウム塩、d N T Pを含有するものが使用される。緩衝成分は、特に限定はないが、例えば、トリシン、トリスー塩酸、リン酸塩（リン酸ナトリウム、リン酸カリウム等）が好適に使用できる。特にトリシン、あるいはリン酸塩を緩衝成分として含有するバッファーが本発明に好適である。該緩衝成分の最終濃度は 5 mM ~ 100 mM の範囲、特に好ましくは 20 mM ~ 50 mM の範囲であり、また pH 6.0 ~ 9.5、特に好ましくは pH 7.0 ~ 9.2 の範囲のものが使用される。例えば、22 mM ~ 46 mM のトリシンを含有する pH 7.5 ~ 9.2 のバッファー、あるいは 25 mM ~ 50 mM のリン酸カリウムを含有する pH 7.0 ~ 8.0 のバッファーが好適に使用される。また、マグネシウム塩としては、特に限定はないが、例えば、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムあるいは硫酸マグネシウムが好適に使用でき、その濃度は、最終濃度で 1 mM ~ 20 mM、特に好ましくは 2 mM

～10 mMの範囲である。また、DNA伸長反応の基質となるdNTP混合物（dATP、dCTP、dGTP、dTTP）は、最終濃度で、それぞれ0.1 mM～3.0 mM、特に好ましくは0.2 mM～1.2 mMの範囲である。使用するプライマーの量は、反応液量50 μ l当たり1 pmol～1000 pmolの範囲であり、特に10 pmol～100 pmolの範囲が好ましい。さらに、反応液中には増幅反応の安定化等を目的とした添加物を共存させることができ、最終濃度0.1%以下のBSA、最終濃度10%以下のジメチルスルホキシド、あるいは最終濃度4 mM以下のプトレスシン2塩酸塩あるいは0.01%以下のプロピレンジアミンを添加してもよい。この他、NMP（1-メチル2ピロロリジノン）、グリセロール、ポリ（エチレングリコール）、ジメチルスルフォキシドおよび／またはホルムアミドを含んでもよく、これらの有機溶媒の添加により、オリゴヌクレオチドプライマーの非特異的なアニーリングが軽減されることが期待される。

【0046】

エンドヌクレアーゼは、例えば、大腸菌由来のRNase Hならば、反応液量50 μ l当たり3～200 Uの範囲が好ましく、特に15 U～60 Uの範囲が好適である。また、DNAポリメラーゼは、例えば、BcaBEST DNAポリメラーゼならば、反応液量50 μ l当たり0.5 U～100 Uの範囲、特に1 U～22 Uの範囲が好ましい。特に、前者についてはその種類によって好適に使用できるユニット数が異なる場合が予想されるが、その際には増幅産物量が最大になるように該バッファの組成および酵素の添加量を調整すればよい。いずれの場合においても、使用する酵素の種類にあわせて反応バッファの組成等を至適化するのとは当然のことである。

【0047】

（5）本発明の核酸配列の増幅方法

本発明の方法は、上記（1）に示されたオリゴヌクレオチドプライマーを少なくとも1種類使用し、さらに上記（2）に示されたエンドヌクレアーゼおよび上記（3）に示されたDNAポリメラーゼを組合わせて実施することができる。当該方法では、伸長反応の基質となるヌクレオチド3リン酸には、PCR法等に使

われる dNTP、すなわち dATP、dCTP、dGTP、dTTP の混合物が好適に使用できる。当該 dNTP は、使用される DNA ポリメラーゼの基質となる限りにおいては、dNTP のアナログ、たとえば 7-デアザ-dGTP 等を含んでいてもよい。また、当該方法では、オリゴヌクレオチドプライマー（キメラオリゴヌクレオチドプライマー）を使用するが、当該プライマーは、例えば、DNA 合成機等を用いて通常の合成方法と同様に調製することができる。

【0048】

本発明の方法において鋳型となる核酸、すなわち DNA または RNA は、当該核酸を含むと推定されているどのような試料から単離したものでもよい。このような核酸を含む試料には特に限定はないが、例えば、細胞、組織、血液のような生体由来試料、食品、土壌、排水のような生物を含有する可能性のある試料が挙げられる。また、前記試料等を公知の方法で処理することによって得られる核酸含有調製物であっても良い。該調製物としては、例えば細胞破砕物やそれを分画して得られる試料、該試料中の核酸、あるいは特定の核酸分子群、例えば、mRNA を富化した試料等が本発明に使用できる。さらに公知方法で増幅された DNA あるいは RNA 等の核酸等も好適に使用できる。

【0049】

これら材料からの核酸含有調製物の調製には特に限定はなく、例えば、界面活性剤による溶解処理、超音波処理、ガラスビーズを用いた振盪攪拌、フレンチプレスの使用等により行うことができる。幾つかの例においては、さらに操作を加えて核酸を精製することが有利である（例えば、内在性ヌクレアーゼが存在するとき）。これらの例において、核酸の精製はフェノール抽出、クロマトグラフィー、イオン交換、ゲル電気泳動または密度勾配遠心分離等の公知方法により実施される。

【0050】

RNA 由来の配列を有する核酸を増幅したい場合には、当該 RNA を鋳型とした逆転写反応によって合成された cDNA を鋳型として本発明の方法を実施すればよい。本発明の方法に適用することができる RNA には、逆転写反応に使用されるプライマーが作製可能なものであれば特に制限はなく、試料中の全 RNA の

他、mRNA、tRNA、rRNA等のRNA分子群、あるいは特定のRNA分子種が挙げられる。

【0051】

上記の逆転写反応に使用されるプライマーは、使用される反応条件において鋳型RNAにアニールするものであれば特に限定されるものではない。該プライマーは、特定の鋳型RNAに相補的な塩基配列を有するプライマー（特異的プライマー）の他、オリゴdT（デオキシチミン）プライマーやランダムな配列を有するプライマー（ランダムプライマー）であっても良い。逆転写用プライマーの長さは、特異的なアニーリングを行う観点から、好ましくは6ヌクレオチド以上であり、更に好ましくは9ヌクレオチド以上であり、オリゴヌクレオチドの合成の観点から、好ましくは100ヌクレオチド以下であり、更に好ましくは30ヌクレオチド以下である。

【0052】

さらに、逆転写用プライマーとして、逆転写後のcDNAを鋳型とした本発明の核酸配列増幅法を行う際に鎖置換反応のためのプライマーとして使用可能なキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用することができる。このようなプライマーは、上記（1）に記載された性質を有し、かつRNAからの逆転写反応に使用できるものであれば特に限定はない。

【0053】

上記の逆転写反応に使用される酵素としては、RNAを鋳型としたcDNA合成活性を有するものであれば特に限定はなく、例えばトリ骨髄芽球症ウイルス由来逆転写酵素（AMV RTase）、モロニーネズミ白血病ウイルス由来逆転写酵素（MMLV RTase）、ラウス関連ウイルス2逆転写酵素（RAV-2 RTase）等、種々の起源の逆転写酵素が挙げられる。このほか、逆転写活性を併せ持つDNAポリメラーゼを使用することもできる。また、本発明の目的のためには、高温で逆転写活性を有する酵素が好適であり、例えばサーマス属細菌由来DNAポリメラーゼ（Tth DNAポリメラーゼ等）、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼ等を使用できる。特に限定はないが、例えば、好熱性バチルス属細菌由来DNAポリメラーゼが好ましく、B. st 由来DNAポ

リメラーゼ（B s t DNAポリメラーゼ）、さらにB. c a由来DNAポリメラーゼ（以下、B c a DNAポリメラーゼと記載する）が好ましい。例えば、B c a DNAポリメラーゼは、逆転写反応にマンガンイオンを必要とせず、また、高温条件下で鋳型RNAの二次構造形成を抑制しながらcDNAを合成することができる。上記の逆転写酵素活性を有する酵素も、当該活性を有している範囲において天然体、変異体のいずれもが使用できる。

【0054】

上記方法により単離したゲノムDNAやPCRフラグメントのような二本鎖DNA、および全RNA若しくはmRNAから逆転写反応で調製されたcDNAのような一本鎖DNAのいずれもが本発明において鋳型DNAとして好適に使用できる。上記二本鎖DNAの場合は、一本鎖DNAに変性する工程（デネーチャー）を施したものが好適に使用できる。また、鋳型がPCR増幅産物のような直鎖状2本鎖DNAにおいては、本発明の方法に用いるプライマーがアニーリングする位置を、該DNAの末端から約50塩基程度内側に設定することにより、前述のデネーチャーの工程を行わなくても本発明の核酸配列の増幅方法を行うことができる場合がある。さらに、RNA由来の配列を有する核酸の増幅を目的とする場合には、本発明のDNAの合成方法に逆転写酵素活性と鎖置換活性とを有するDNAポリメラーゼを使用することにより、RNAを鋳型とした逆転写反応と、当該反応によって生成したcDNAを鋳型にしたDNA増幅反応とを1種類のDNAポリメラーゼで行なうことができる。

【0055】

上記鋳型の長さは、標的配列がその断片中に完全に含まれるか、または標的配列の十分な部分が少なくとも断片中に存在することにより、プライマー配列の十分な結合を提供するようなものがよい。

【0056】

本発明の方法は、鋳型DNAが二本鎖DNAの場合、それらを変性して一本鎖にすることにより鋳型DNA鎖へのプライマーの結合を可能にさせる。二本鎖DNAが変性する温度、例えば約95℃で保持することは好ましい変性法である。他の方法はpHの上昇を含むが、オリゴヌクレオチドプライマーを標的物に結合

させるためには、増幅反応時に pH を低下させる必要がある。上記のような二本鎖を一本鎖 DNA に変性する工程、もしくは、鋳型が RNA の場合、逆転写反応により cDNA (一本鎖 DNA) を調製する工程の後、等温条件下において、下記の工程が並行して連続し、繰返し起こることが本発明の特徴である。

【0057】

[1] 鋳型となる DNA を少なくとも 1 種のオリゴヌクレオチドプライマーとアニーリングさせる工程。

[2] プライマーの 3' 末端から鋳型 DNA に相補的な DNA の伸長反応を行なう工程。

[3] プライマーの 3' 末端と、[2] で伸長させた DNA 鎖の間を切断する工程。

[4] [3] で切断された部位の 3' 末端から DNA 伸長反応を行なうと同時に、[2] で伸長させた DNA 鎖を分解することなく鋳型 DNA から遊離させる工程。

[5] [4] の工程で得られた二本鎖ポリヌクレオチドを用いて [3] ~ [4] の工程を繰り返す工程。

【0058】

上記の反応は、常温でも実施できるが、耐熱性を有する酵素 (エンドヌクレアーゼ、DNA ポリメラーゼ) を使用して高温、例えば 50℃ 以上で実施することにより、プライマーの非特異的なアニーリングを抑制して DNA 増幅の特異性をあげることもできる。さらに該方法においては、逆転写反応および核酸配列の増幅を連続して行なう態様も可能であり、上記反応に逆転写酵素を組み合わせ、あるいは逆転写活性を有する DNA ポリメラーゼを使用して、RNA 由来の配列を有する DNA を増幅することができる。

【0059】

なお、本明細書において「連続的に」とは、反応温度、反応液組成の変更を伴わずに反応が進行していることを意味する。

【0060】

また、本明細書において「等温」とは、酵素および核酸鎖が上記各工程におい

て機能する、実質的に一定の温度条件のことを意味する。

【0061】

本発明の第1の態様は、一本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも1種類のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

すなわち、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸配列を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されている工程；

(b) (a)工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(c) (b)工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

【0062】

本発明の第2の態様は、一本鎖のDNAを鋳型として、少なくとも2種類の本発明のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを用いて行なう核酸配列の増幅方法である。

すなわち、少なくとも2種類のプライマーを使用し、核酸配列を増幅するための方法であって、

(a) 鋳型となる核酸を該核酸の塩基配列の一部に実質的に相補的な少なくとも1種類のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して上記鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで上記プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドは、エンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置されている工程；

(b) (a) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；

(c) (b) 工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (b) 工程に再度利用される工程；

(d) (c) 工程で得られる遊離した置換鎖を鋳型として (a) 工程で使用されたプライマーとは異なる少なくとも 1 種のプライマーと DNA ポリメラーゼにより処理して、置換鎖に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であって、ここで (a) 工程で使用されたプライマーとは異なるプライマーは置換鎖の塩基配列の一部に実質的に相補的なデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであって、リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のために該プライマーの 3' 末端に配置されている工程；

(e) (d) 工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；および

(f) (e) 工程で得られる、プライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の 3' 末端より、鎖置換活性を有する DNA ポリメラーゼによって鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程であって、再生されたプライマー伸長鎖を含む二本鎖核酸が (e) 工程に再度利用される工程；

を包含することを特徴とする核酸配列の増幅方法である。

【0063】

本発明の第 3、第 4 の態様は、二本鎖の DNA を変性して一本鎖 DNA とする前処理の後に、当該一本鎖 DNA を鋳型としてそれぞれ第 1、もしくは第 2 の態様の核酸配列の増幅を行う方法である。

【0064】

さらに、本発明の第 5、第 6 の態様は、RNA を鋳型とした逆転写反応により一本鎖の cDNA を調製した後、当該 cDNA を鋳型としてそれぞれ第 1、もしくは第 2 の態様の核酸配列の増幅を行う方法である。

【0065】

上記の本発明の態様のいずれにおいても、まず一本鎖の鋳型DNAに該DNAに相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる。次にDNAポリメラーゼの作用により、当該プライマーの3'末端より鋳型DNAの残りの長さに沿って鋳型DNAに相補的なDNA（プライマー伸長鎖）を伸長させて二本鎖DNAを合成する。エンドヌクレアーゼは当該二本鎖DNAに作用してキメラオリゴヌクレオチドプライマー中のリボヌクレオチド部分の3'末端側を切断するが、これ以外の部分は切断しない。即ち、エンドヌクレアーゼは上記の二本鎖DNAにニックを入れるニッキング酵素として作用する。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼがニックの入った二本鎖DNAのニックの3'側からDNA鎖を再伸長して新たなプライマー伸長鎖を生成し、同時にニックの5'末端から下流のDNAを遊離させる。こうして先に合成されたプライマー伸長鎖が新たなプライマー伸長鎖に置換される。

【0066】

本発明において、「鎖置換活性」とは、鋳型となる核酸配列に従ってDNA複製を行う際、DNA鎖を置き換えながら進行し、鋳型鎖にアニーリングしている相補鎖を遊離させる、即ち鎖置換（strand displacement）することができる活性のことをいう。

【0067】

本発明の方法において、「置換鎖」とは、鎖置換により鋳型となる核酸配列から遊離したDNA鎖のことを言う。

【0068】

本発明において、「再生されたプライマー伸長鎖」とは、鎖置換により新たに複製に用いられたオリゴヌクレオチドプライマーから伸長した、鋳型となる核酸配列に相補的なDNA鎖のことを言う。

【0069】

本発明において、「再度利用され」とは、鋳型となる核酸配列と再生されたプライマー伸長鎖で構成された二本鎖DNAを再度鎖置換の工程に利用することを言う。

【0070】

本発明の核酸配列増幅方法は、鋳型核酸に相補的なキメラオリゴヌクレオチドプライマーと、置換鎖に相補的なもう1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーの2種のプライマーを使用して実施することができる。この場合、一方のプライマーは鋳型となるDNA鎖に結合して鎖置換反応を起し、そして他方のプライマーは上記の鎖置換反応によって遊離した置換鎖に結合し、新たな鎖置換反応を開始する。この態様を使用すると、各反応産物が他のプライマーのための鋳型として機能できることは明らかである。このように鋳型量が増加することにより、非直線的に増幅産物が増加していく。

【0071】

二本鎖DNAを鋳型に用いて本発明の核酸配列増幅方法を実施する場合には、二本鎖DNAを変性する前または後に、キメラオリゴヌクレオチドプライマー、4種のデオキシリボヌクレオチド3リン酸(dNTP)、DNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼを反応液に添加する。熱処理により二本鎖DNAを変性し、かつ耐熱性の酵素を使用しない場合には、変性後に酵素を添加することが好ましい。

【0072】

上記(2)に記述されたように、この方法において使用されるエンドヌクレアーゼは、プライマーのリボヌクレオチド部分において鎖を切断するように選択すべきである。特に好ましくはリボヌクレオチドの3'側である。さらにDNAポリメラーゼは、ニックの入ったDNA鎖を合理的な速度で解離させるように選択されるべきである。

【0073】

本発明に使用されるDNAポリメラーゼは、ニックの入った部位から下流への伸長鎖合成に伴い、先に伸長されたDNA鎖の置換を行う必要がある。そして重要なことは置換鎖を分解する可能性のある5'→3'エキソヌクレアーゼ活性を示さないことである。このようなDNAポリメラーゼ、例えば大腸菌由来のDNAポリメラーゼIのエキソヌクレアーゼ欠損変異体であるクレノウ断片、Bst DNAポリメラーゼ由来の同様の断片(バイオラッド社製)、Bca由来のB

c a B E S T DNAポリメラーゼ（宝酒造社製）が有用である。シークエネース 1. 0 およびシークエネース 2. 0（米国バイオケミカル社）、T 5 DNAポリメラーゼおよび ϕ 2 9 DNAポリメラーゼも使用することができる。通常はエキソヌクレアーゼ活性を有するポリメラーゼであっても、その活性が適当な阻害剤の添加により阻害することが可能な場合は、本発明のDNA合成方法に使用できる。

【 0 0 7 4 】

本発明の核酸配列の増幅方法のさらなる特徴は、合成において温度を上げ下げする必要がないことにある。即ち、本発明は等温での核酸配列の合成方法を提供する。従来の多くの核酸増幅法は、温度を上下することにより合成鎖から標的物を解離する必要があり、例えばサーマルサイクラーのような特別な反応装置を必要とするが、本発明の方法においては一定温度を保持できる装置のみでも実施することができる。。

【 0 0 7 5 】

このように、本発明の方法は、単一の温度で実施することができる。好ましくは、プライマーの非特異的なアニーリングが低減され、かつ鑄型となる核酸配列にプライマーが特異的にアニーリングするように反応温度、ストリンジェンシーのレベルを設定して実施される。さらに、酵素活性が十分に保持される適当な温度が好適である。このため、該温度は、好ましくは、約 2 0 °C から約 7 0 °C であり、さらに好ましくは、約 3 5 °C から約 6 5 °C にするのがよい。

【 0 0 7 6 】

また、本発明の方法において、逆転写酵素活性を持つDNAポリメラーゼ、例えば、B c a B E S T DNAポリメラーゼを使用した場合、RNAからcDNAを調製する工程（逆転写反応）を含むRNA由来の核酸配列の増幅を簡便に実施することができる。また、RNAからcDNAを調製する工程を独立させて行い、その生成物（cDNA）を本発明の方法に鑄型DNAとして使用することもできる。

【 0 0 7 7 】

いずれの場合においても、本発明の方法においては、適当な方法、例えば酵素

を失活させたり反応温度を低下させて反応を停止させるか、または試薬のうちの一つが使い尽くされるかのいずれかまで繰り返される。

【 0 0 7 8 】

図 1 は、一本鎖 DNA を鋳型にし、2 種のプライマーを使用する場合を図示したものである。各工程を下記に示すが、各工程は並行、連続して行われる。

(1) 鋳型となる一本鎖 DNA とキメラオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程。

(2) プライマーの 3' 末端から DNA 伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程。

(3) プライマーの 3' 末端側のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程。

(4) (3) の切断した部位より DNA ポリメラーゼにより鎖置換する工程

(5) (4) の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖からなる二本鎖 DNA が (3) の工程に再度利用され、また遊離した置換鎖が (6) の工程以降の反応に利用される工程。

(6) (5) の工程の遊離した置換鎖を鋳型として (1) と異なるオリゴヌクレオチドプライマーをアニーリングさせる工程。

(7) プライマーの 3' 末端から DNA 伸長反応を行ない、プライマー伸長鎖ができる工程。

(8) プライマーの 3' 末端側のリボヌクレオチドを含有する部位をエンドヌクレアーゼを用いて切断する工程。

(9) (8) の切断した部位より DNA ポリメラーゼにより鎖置換する工程

(10) (9) の工程で得られた鋳型および再生されたプライマー伸長鎖が (8) の工程に再度利用される工程。

【 0 0 7 9 】

二本鎖 DNA が鋳型の場合は、一本鎖 DNA への変性処理の後、それぞれの DNA 鎖が上記工程 (1) の鋳型になる。従って、得られる増幅産物の量は、一本鎖の DNA を鋳型にする場合よりも多く、また増幅産物の検出においては、一本鎖 DNA を鋳型にする場合よりも短時間で行なうことができる。

【0080】

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴の一つとして、一本鎖のDNAを調製することが可能なことが挙げられる。この目的のためには、1種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法のみならず、2種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用する方法を使用することもできる。例えば、2つのオリゴヌクレオチドプライマーを用いる場合は、一方のオリゴヌクレオチドプライマー量を他方の量に対して過剰にして増幅反応を行なう、いわゆるアシンメトリック（非対称）-PCR法において採用される方法と同様のプライマー比率によって行なうことができる。この結果、一方の鎖を置換した産物の量が、他方の鎖を置換した産物の量に比べて過剰になる。

【0081】

本発明の核酸配列の増幅方法によれば実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAを調製することができ、例えば、DNAチップのような核酸固定化物に固定するための一本鎖DNA、標的核酸検出のための一本鎖DNAプローブ、または長鎖PCR法のためのメガプライマーを容易にしかも短時間に作製することができる。また、本発明の方法を使用することにより、センス配列のみ、あるいはアンチセンス配列のみを選択して増幅させることが可能である。従って、本発明はセンス配列あるいはアンチセンス配列を有する核酸の製造方法としても有用である。

【0082】

さらに、本発明の核酸配列の増幅方法には経時的な温度調節が可能な反応装置を使用する必要がないため、大容量の反応液を使用して増幅反応を実施することができる。したがって、例えば医薬用途等に使用される核酸の工業的大量製造が可能である。

【0083】

(6) 本発明の核酸配列の増幅方法のためのキット

本発明は、前述の第1～第6の態様に記載の核酸配列の増幅方法に使用されるキットを提供する。1つの実施態様において、該キットは、パッケージされた形態において、鎖置換反応におけるDNAポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ

の使用のための指示書を含むことを特徴とする。さらに、鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼ、エンドヌクレアーゼならびに鎖置換反応用緩衝液を含むキットは本発明の方法に好適に使用される。あるいは、市販の鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼおよび／またはエンドヌクレアーゼを指示書に従って選択し、使用してもよい。さらに、RNAを鋳型とする場合の逆転写反応用試薬を含んでもよい。DNAポリメラーゼは、上記（３）記載の本発明に使用されるDNAポリメラーゼから選択することができる。また、エンドヌクレアーゼは、上記（２）記載のエンドヌクレアーゼから選択することができる。さらに、該鎖置換反応用緩衝液は、上記（４）記載の反応バッファー組成を有するものが好適に使用できる。

【0084】

上記「指示書」とは、当該キットの使用方法、例えば鎖置換反応用試薬液の調製方法、推奨される反応条件等を記載した印刷物であり、パンフレットまたはリーフレット形式の取り扱い説明書のほか、キットに添付されたラベル、キットが納められたパッケージ等に記載されたものを含む。さらに、インターネットのよ
うな電子媒体を通し、開示、提供された情報も含まれる。

【0085】

（７）本発明の核酸配列の検出方法および該方法のためのキット

本発明の核酸配列の増幅方法を使用することにより、試料中の標的核酸の検出を行うことができる。当該検出方法は、

（a）上記の本発明の核酸配列の増幅方法により、標的核酸を増幅する工程；および

（b）上記工程により増幅された標的核酸を検出する工程；
を包含する。

【0086】

上記方法は試料中に存在する遺伝子の検出に有用であり、例えば、試料中の微生物を当該微生物に由来する遺伝子の有無によって検出する方法等に利用することができる。

【0087】

上記（b）工程には公知の核酸検出方法、例えば電気泳動により特定のサイズの反応産物を検出する方法や、プローブとのハイブリダイゼーションによる検出等を使用することができる。電気泳動による検出ではエチジウムブロマイド等の蛍光物質が使用されるが、プローブとのハイブリダイゼーションを組み合わせてもよい。また、プローブは放射性同位元素による標識の他、ビオチンや蛍光物質のような非放射性的の標識を施したものが使用できる。この他、上記（a）工程において標識ヌクレオチドを使用することにより増幅産物の検出を容易とすることや、蛍光偏光法、蛍光エネルギー転移等を利用した検出を行うことも可能である。さらに、適切な検出系を構築することにより、標的核酸を自動的に検出することや、あるいは標的核酸の定量を行うことが可能である。

【0088】

消光状態になるような距離で配置された2種類以上の蛍光物質で標識されたりボヌクレオチド（RNA）プローブを本発明の検出方法に使用することができる。当該プローブは蛍光を発することはないが、これに相補的な標的核酸由来の増幅DNAにアニーリングした場合、RNase Hは該プローブを分解する。この結果、プローブ上の蛍光物質間の距離が増大して蛍光が発せられるようになり、標的核酸の存在を知ることができる。RNase Hを使用して本発明の核酸配列の増幅方法が実施された場合には、その反応液中にプローブを添加するだけで標的核酸を検出することができる。当該プローブの標識に使用される蛍光物質としては、例えば、6-FAM（6-carboxyfluorescein）とTAMRA（N,N,N',N'-tetramethyl-6-carboxyrhodamine）との組み合わせが好適に使用できる。

【0089】

本発明の核酸配列の増幅方法では、サーマルサイクラーのような装置を必要とせず、使用するプライマーを1種類もしくは2種類と従来法よりも少なくすることができる。dNTPのような試薬もPCR等で用いられるものを流用できるため、ランニングコストを従来法よりも低くすることができる。そのため、ルーチンワークを行なっている遺伝子検査等の分野で好適に使用できる。さらに、本発明の方法はPCR法よりも短時間により多くの増幅産物を得られることから、簡便、迅速、高感度な遺伝子検出方法として利用することができる。

【0090】

さらに、本発明においては、上記の標的核酸の検出方法に使用されるキットが提供される。該キットは、上記の本発明の核酸配列の増幅方法のためのキットを使用することができる。さらに、標的核酸の増幅に使用するためのキメラオリゴヌクレオチドプライマー、増幅された標的核酸を検出するための試薬、例えばプローブ等を含むものであってもよい。

【0091】

(8) 本発明の核酸固定化物とその製造方法

DNAチップは、スライドガラス等の固相担体に、多数の異なる遺伝子あるいはDNAの断片を整列させて固定化した核酸固定化物であり、DNAマイクロアレイ (DNAアレイ) とも呼ばれる。DNAチップは、試料より調製した核酸試料、好ましくは標識された核酸試料と接触させてハイブリダイゼーションを行うことにより、核酸試料中に存在する、DNAチップ上に固定化されたDNAと相補的な配列を有する核酸の存在を調べる目的で使用される。試料中の多数の核酸を一度の操作で検出、定量できることから、DNAチップは遺伝子の発現解析や変異あるいは多型解析を飛躍的に加速させる手段として非常に有用である。二本鎖核酸が固定化されたDNAチップは適切な変性処理の後にハイブリダイゼーション工程に使用されるが、検出しようとする標的核酸に相補的な一本鎖DNAが固定化されたDNAチップは、標的核酸の検出に特に好適である。

【0092】

上記のように、本発明の方法により所望のDNAを一本鎖の状態を増幅することができる。こうして得られたDNA、特に好ましくは実質的にその相補鎖を含有しない一本鎖のDNAは、DNAチップ上に固定するDNA断片として好適に使用できる。即ち、本発明の方法は、DNAチップ作製において固定化するDNAを調製する方法として好適に使用できる。こうして得られたDNAを固定する担体は不溶性のものであれば特に限定はなく、ガラス、プラスチック等で作製された板状の担体の他、ニトロセルロースやナイロン製の膜状の担体が好適に使用される。また、その固定化にあたっては公知の核酸固定化方法が使用できる。上記のDNAはそのまま担体に固定化を行う他、適当なリンカーを介して、または

複数分子のDNAをライゲーションさせたうえで固定化してもよい。

【0093】

本発明の方法により増幅されたDNAを固定化された核酸固定化物、例えばDNAチップを試料より調製された標的核酸を含む可能性のある核酸試料と接触させ、ハイブリダイゼーションを実施することにより、当該核酸固定化物上の核酸とハイブリダイズした標的核酸を検出、定量することができる。特に、本発明の方法により増幅された一本鎖のDNAを固定化されたDNAチップは、従来よりも簡便な操作で、かつ、高感度、高再現性での標的核酸の検出を可能とする。

【0094】

(9) 本発明の核酸の大量製造方法

上記のように、本発明により等温で実施可能な核酸配列の増幅方法が提供される。該方法は、増幅しようとする核酸の鋳型となる核酸の他、反応に必要な各種成分を混合して等温で条件で反応させることにより、所望の核酸を製造することができる。PCR法では反応混合物の温度を経時的に変化させる必要があるため、反応のスケールは温度制御が可能な容量（通常、200 μ l以下）に限られ、スケールアップは困難である。一方、本発明の方法にはこのような制約はなく、反応混合物の容量を増加させることにより大量の核酸を製造することが可能である。当該方法は1分子の鋳型から多数の相補鎖分子が合成され、さらにこれらの相補鎖分子を鋳型とした核酸の合成も可能であることから、鋳型ならびにプライマーを適切に設定することにより、所望の核酸を効率よく、大量に製造することができる。さらにまた、本発明の方法がPCR法のような特殊な装置、頻繁な温度変化を必要としないことは設備、エネルギーのコスト面からも有利であり、工業的な核酸の大量製造方法としても優れている。

【0095】

核酸を含有する医薬としては、細胞内において有用なポリペプチドを発現させるための二本鎖DNA、目的の遺伝子の発現を抑制するための一本鎖アンチセンスDNA等があり、これらは適切な手段、例えばリポソーム等の遺伝子導入用担体を使用して生体に投与される。本発明の核酸の製造方法は、上記のような医薬用途等の一本鎖、もしくは二本鎖の核酸を大量に製造するための方法として好適

である。さらに、本発明の方法では、例えば生体内での分解を抑制するような d N T P のアナログを含有する核酸を製造することも容易である。

【 0 0 9 6 】

本発明において増幅された D N A 断片は通常のヌクレオチドにより構成されるため、増幅された D N A はその内部の制限酵素部位を用いて適当なベクターにサブクローニングすることができる。さらに R F L P のような制限酵素を用いた処理をすることも問題なくでき、遺伝子検査の分野においても広く利用できる。また、本発明において増幅された D N A 断片は、通常のヌクレオチドにより構成されるため、増幅断片中に R N A ポリメラーゼのプロモーター配列を組込んでおけば、増幅断片を鋳型として R N A を合成し、例えば、合成された R N A をプローブとして使用可能である。当然ながら、通常の d N T P の代わりに蛍光標識された d N T P を使用して本発明の核酸配列増幅方法を実施することにより、蛍光標識された D N A プローブを作製することができる。

【 0 0 9 7 】

本発明の方法において、最終的に増幅される断片は、その両端に増幅に使用するプライマーに相補的な塩基配列を有さないため、増幅産物の持ち込みによるコンタミネーションを軽減させることができる。従って、ルーチンワークで同じ領域を増幅する遺伝子検査等において有用である。

【 0 0 9 8 】

本発明の核酸配列の増幅方法の特徴を以下に列挙する。

1. 少ない鋳型量より、大量の核酸を増幅することができる。2 種のプライマーを使用した場合には増幅産物は 2 次関数的に増加する。
2. 等温で実施でき、サーマルサイクラーのような装置を必要としない。このため、容易に反応容量をスケールアップすることができる。
3. 通常、増幅反応は 1 または 2 種のキメラオリゴヌクレオチドプライマーと 2 種の酵素（D N A ポリメラーゼおよびエンドヌクレアーゼ）で実施される。
4. 1 分子のプライマーより多数の D N A 鎖が合成されるため、プライマー量が増幅産物量を制限することがない。
5. 一本鎖、二本鎖の D N A を選択的に増幅することができる。

5. 増幅反応に (α -S) dNTP のような dNTP アナログを必要としないため、試薬コストが安価である。また、dNTP アナログを含有しない、天然型の核酸を取得することが可能である。

以上のように、本発明の方法は工業的スケールでの核酸製造に適した方法である。

【0099】

【実施例】

本発明を実施例により更に具体的に説明するが、本発明はこれらの実施例によって限定されるものではない。

【0100】

参考例

本発明の方法に使用される RNase H のユニット数は、以下の方法で測定した。

(1) 使用する試薬液の調製

力価測定用反応液：最終濃度がそれぞれ 40 mM トリス-塩酸 (pH 7.7、37℃)、4 mM 塩化マグネシウム、1 mM DTT、0.003% BSA、4% グリセロール、24 μ M ポリ (dT) になるように滅菌水で調製した。

ポリ [8-³H] アデニル酸溶液：370 kBq のポリ [8-³H] アデニル酸溶液を 200 μ l の滅菌水に溶解した。

ポリアデニル酸溶液：ポリアデニル酸を 3 mM になるように滅菌超純水で希釈した。

酵素希釈液：最終濃度がそれぞれ 25 mM トリス-塩酸 (pH 7.5、37℃)、5 mM 2-メルカプトエタノール、0.5 mM EDTA (pH 7.5、37℃)、30 mM 塩化ナトリウム、50% グリセロールになるように滅菌水で調製した。

熱変性子牛胸腺 DNA の調製：子牛胸腺 DNA 200 mg を TE バッファー 100 ml に懸濁し、膨潤させた。該溶液の UV 260 nm の吸光度を測定し、1 mg/ml の濃度に滅菌超純水で希釈した。次に、該溶液を 100℃ で 10 分間加熱後、氷浴中で急冷した。

【0101】

(2) 活性測定方法

上記(1)で調製した力価測定用反応液 $985\mu\text{l}$ にポリ $[8-^3\text{H}]$ アデニル酸溶液 $7\mu\text{l}$ を加え 37°C で10分間保持した。次にポリアデニル酸を最終濃度が $24\mu\text{M}$ になるように $8\mu\text{l}$ 加え、さらに 37°C で5分間保持した。このようにしてポリ $[8-^3\text{H}]$ rA-ポリdT反応液 $1000\mu\text{l}$ を調製した。次に、該反応液 $200\mu\text{l}$ を分取し、 30°C で5分間保持した後、任意の希釈系列で希釈した酵素液 $1\mu\text{l}$ を加え、これらの反応液を経時的に $50\mu\text{l}$ ずつサンプリングして、後の測定に用いた。酵素添加からサンプリングまでの間の時間をY分とした。また、全CPM用反応液 $50\mu\text{l}$ およびブランク用反応液 $50\mu\text{l}$ は、酵素液の代わりに酵素希釈液を $1\mu\text{l}$ 加えて調製した。該サンプリング溶液に 100mM ピロリン酸ナトリウム $100\mu\text{l}$ 、熱変性子牛胸腺DNA溶液 $50\mu\text{l}$ および 10% トリクロロ酢酸 $300\mu\text{l}$ (全CPM測定の場合は、超純水 $300\mu\text{l}$) を加え、 0°C で5分間保持後、 10000rpm で10分間遠心した。遠心後、得られた上清 $250\mu\text{l}$ をバイアルに入れ、アクアゾルー2 10ml を加え、液体シンチレーションカウンターでCPMを測定した。

【0102】

(3) ユニット計算

各酵素のユニット (Unit) 数は、以下の計算式で算出した。

$$\text{Unit}/\text{ml} = \{ (\text{測定したCPM} - \text{ブランクCPM}) \times 1.2^* \times 20 \times 1000 \times \text{希釈率} \} \times 200 (\mu\text{l}) / (\text{全CPM} \times Y \text{分} \times 50 (\mu\text{l}) \times 9^{**})$$

1. 2^* : 全CPM中に含まれるポリ $[8-^3\text{H}]$ rA-ポリdTの $50\mu\text{l}$ 当たりの nmol 数

9^{**} : 補正係数

【0103】

実施例1

(1) 鋳型DNAとプライマーの合成

本実施例に鋳型として使用した99塩基の一本鎖DNAおよびプライマーは、DNA合成機 (アプライド・バイオシステム社製) を用いて合成した。配列表の

配列番号 1 に上記の 99 塩基の一本鎖 DNA の塩基配列を示す。また、配列表の配列番号 2 および 3 に、それぞれ上流プライマーおよび下流プライマーの基本的な塩基配列を示す。本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す。

【0104】

プライマー対 1：配列表の配列番号 2 および 3 に示される塩基配列を有し、その全体がすべてデオキシリボヌクレオチドで構築されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 2：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ 3' 末端から 2 個めリボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 3：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端のデオキシリボヌクレオチドのみがリボヌクレオチドに置換され、かつ当該リボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 4：プライマー対 1 のプライマーの、それぞれの 3' 末端から 2 個のデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換されたプライマーの組み合わせ。

プライマー対 5：プライマー対 1 のプライマーのそれぞれの 3' 末端から 3、4 個めのデオキシリボヌクレオチドがリボヌクレオチドに置換され、かつ 3' 末端から 4 個めリボヌクレオチドの 5' 側リン酸結合がホスホロチオエート結合に置換されたプライマーの組み合わせ。

【0105】

(2) 増幅反応

5' → 3' エキソヌクレアーゼ活性を欠損させたバチルス・カルドテナックス由来の DNA ポリメラーゼである BcaBEST DNA ポリメラーゼ（宝酒造社製）と、大腸菌由来の RNase H である cloned リボヌクレアーゼ H（宝酒造社製）を用いて、以下のモデル 1～7 の反応系について検討した。

【0106】

反応液は、下記のように調製した。

35 mM トリス塩酸バッファー (pH 7.5)、0.1 mg/ml BSA (牛血清アルブミン)、2.7% グリセロール、5% ジメチルスルオキシド、各 1.4 mM dNTP 混合物、10 mM 塩化マグネシウム、それぞれ 20 pmol の (1) のプライマー対もしくはその一方のプライマー、ならびに 0.6 ng の合成一本鎖鋳型 DNA、5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼ、60 U の cloned リボヌクレアーゼ H、反応液の最終容量 50 μ l。上記反応液を均一に混合し、55℃、60 分間保温した後、90℃、2 分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の 8 μ l を 3% ヌシーブ 3:1 アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。以下に各モデルに使用されたプライマーを示す。

【0107】

モデル 1~5: それぞれプライマー対 1~プライマー対 5 を使用

モデル 6: プライマー対 2 のうちの下流プライマーのみを使用

モデル 7: プライマー対 4 を使用し、RNase H を添加しない

【0108】

その結果、モデル 2~5 の反応液を使用した場合、74 b (base) の一本鎖 DNA 断片と 49 b の一本鎖 DNA 断片とが 2 本鎖を形成していると推測されるバンドが電気泳動にて確認され、これらの反応系で DNA が増幅されることが明らかとなった。また、一方のプライマーのみを使用したモデル 6 においても、予想される 74 b の増幅断片 (一本鎖 DNA 断片) が確認できた。なお、モデル 1 および 7 の反応では DNA の増幅はまったく認められなかった。

【0109】

(3) 増幅産物の確認

上記 (2) の、モデル 4 の反応によって得られた反応液をマイクロコンー 100 (宝酒造社製) を用いてろ過した後、フィルターにトラップされた増幅 DNA 断片を回収した。該 DNA 断片の塩基配列をジデオキシ法により解析した。その結果、上記の反応によって増幅された断片が鋳型 DNA と同じ塩基配列を持つ D

NAである事が確認された。

【0110】

(4) 反応時間の検討

上記(2)のモデル2の反応液を調製し、これを種々の時間反応させた場合の増幅産物量の変化を調べた。当該反応液を、0、15、30、60、90、120分間、それぞれ55℃で保温した後、90℃、2分間の処理により酵素を失活させた。各反応液8 μ lを3% ヌシーブ3:1アガロースゲルを使用した電気泳動にて解析した。電気泳動の結果を図2に示す。図中1~6はそれぞれ0、15、30、60、90、120分間反応した反応液の泳動されたレーンを、また、Mは分子量マーカーとして、100bp DNA ladder marker (宝酒造社製)が泳動されたレーンを示す。

【0111】

図2に示されるように、反応時間が0分では増幅産物は確認できなかったが、反応時間が15分、30分、60分と長くなるに従い、増幅産物量が増大していることが確認できた。しかし、60分以上の反応では、電気泳動によって確認される増幅産物量はほぼ横ばいであり、使用された反応系での増幅は60分程度でプラトーに達することが示された。

【0112】

実施例2

(1) RNAの調製

本実施例に鋳型として使用するRNAは、ヒト培養細胞HT29 (ATCC HTB-38) (大日本製薬社製)からライゾール試薬(ライフテック社製)を用いて調製した。得られたトータルRNAは、その濃度を1 μ g/ μ lに調製した。またRNAの純度を分光工学的に調べたところ、OD260/OD280=1.8であった。

【0113】

(2) 増幅反応

逆転写活性およびDNAポリメラーゼ活性を有するBcaBEST DNAポリメラーゼとRNase Hエンドヌクレアーゼを用いて、RNAからのcDNA

が増幅されるかを検討した。

【0114】

反応液には1 μ g相当の上記トータルRNAを加え、実施例2と同様の組成に調製した。ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を増幅のターゲットとし、プライマーとして実施例1に記載のプライマー対2を用いた。

【0115】

上記の反応液を55℃、60分間保温した後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。この反応液のうちの8 μ lを3% ヌシーブ3:1アガロースゲルにて電気泳動したところ、予想される56bpの増幅断片が確認できた。さらに、ターゲットとした塩基配列を有するプローブを用いたサザンハイブリダイゼーションを行なった。その5'末端にビオチン標識を付した、配列表の配列番号4に示される塩基配列のDNAプローブを使用してサザンハイブリダイゼーションを行ったところ、このプローブは上記の増幅断片にハイブリダイズした。即ち、本発明の方法によりターゲットとした領域が正しく増幅されていることが確認された。

【0116】

実施例3

(1) プライマーの合成

二本鎖DNAを鋳型とした場合の本発明の増幅方法について検討した。使用するプライマーは、DNA合成機（アプライド・バイオシステム社製）を用いて合成した。配列表の配列番号5～13にプライマーの基本的な塩基配列を示す。さらに、本実施例に使用されたプライマーの詳細な構造を以下に示す。プライマー対A～Fまでは、pUC19DNAを鋳型とした。プライマー対Gの場合は、実施例2で得られたヒト全RNAより配列表の配列番号14および15記載のプライマーおよびTaKaRa RNA PCR Kit (AMV) Ver. 2.1（宝酒造社製）を用いて、添付の標準プロトコールに従って調製した二本鎖DNA増幅断片を鋳型とした。

【0117】

プライマー対A（増幅断片長約450bp）：配列表の配列番号5および6に

示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対B（増幅断片長約250bp）：配列表の配列番号5および7に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対C（増幅断片長約520bp）：配列表の配列番号5および8に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対D（増幅断片長約890bp）：配列表の配列番号5および9に示される塩基配列を有し、その3'末端2塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対E（増幅断片長約130bp）：配列表の配列番号10および6に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対F（増幅断片長約220bp）：配列表の配列番号11および6に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

プライマー対G（増幅断片長約320bp）：配列表の配列番号12および13に示される塩基配列を有し、その3'末端3塩基がリボヌクレオチドに置き換わったプライマーの組み合わせ。

【0118】

（2）増幅反応

反応液は、下記のように調製した。

35mMリン酸カリウムバッファー（pH7.5）、0.1mg/ml BSA（牛血清アルブミン）、5%ジメチルスルオキシド、各1.4mM dNTP混合物、10mM塩化マグネシウム、それぞれ60pmolの（1）のプライマー対、ならびに100ngのpUC19鋳型DNA、5.5UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60UのRNaseH、反応液の最終容量50μl。

反応条件は以下のとおりである。DNAポリメラーゼおよびRNaseH無添

加の反応液を 98℃、1 分間熱変性処理後、55℃に冷却し、DNA ポリメラーゼおよび RNase H を混合し、55℃、60 分間保温した。反応終了後、90℃、2 分間加熱して酵素を失活させた。その後、各反応液の 8 μl を 3% ヌシープ 3:1 アガロースゲルにて電気泳動を行なった。

【0119】

その結果、いずれのプライマー対においても目的の増幅断片が得られることが確認できた。即ち、本発明の増幅方法において、2 本鎖 DNA を鋳型として増幅反応を行うことができることを確認した。

【0120】

(3) 増幅産物の制限酵素消化

本発明の増幅方法を用いて得られた増幅断片の制限酵素消化について検討した。鋳型 DNA として、pUC19 プラスミド DNA を用いた。配列表の配列番号 5~6 に記載の pUC19 upper (2) NN プライマーおよび pUC19 lower NN プライマーを使用した。なお、該プライマーは、いずれも 3' 末端の 2 塩基がリボヌクレオチドに置き換わったものを用いた。下記に反応液組成を示す。

反応液 A: 35 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.5)、10 mM 塩化マグネシウム、1.4 mM dNTP 混合物、0.01% BSA、5% DMSO、2.7% グリセロール、各 100 pmol ずつの pUC19 upper (2) NN プライマーおよび pUC19 lower NN プライマー、500 ng の pUC19 DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を 48 μl に調製した。

【0121】

上記反応液を 98℃、1 分間熱変性処理した後、55℃に冷却した。次に、60 U の E. coli RNase H および 5.5 U の BcaBEST を添加し、反応液量を 50 μl にした。該反応液を 55℃で 1 時間インキュベーションした。反応終了後、90℃、2 分間加熱処理して酵素を失活させた。その反応液を 3% アガロースゲル電気泳動して、得られた増幅産物を精製した。回収された増幅産物は、100 μl の滅菌蒸留水に再懸濁した。

【0122】

上記DNA溶液を使用して制限酵素消化を行った。制限酵素は、AccII（宝酒造社製）およびBcnI（宝酒造社製）を使用した。以下に反応液組成を示す。

DNA溶液 3 μ l、10×AccII添付バッファーあるいは10×BcnI添付バッファーを1 μ l、制限酵素AccIIあるいはBcnIを1 μ l、さらに滅菌蒸留水で反応液容量を10 μ lに調製した。該反応液を37℃、30分間反応後、10×ローディングバッファー（loading buffer）を1.5 μ l加え、そのうちの6 μ lを3%ヌシーブアガロースゲルで電気泳動した。

【0123】

その結果、AccIIおよびBcnIのいずれの制限酵素においても目的とする制限酵素消化DNA断片が得られた。

【0124】

（4）突然変異検出

本発明の増幅方法を用いた突然変異検出について検討した。鋳型としてpUC19を用いた。配列表の配列番号5～6にpUC19 upper (2) NNプライマーおよびpUC19 lower NNプライマーの基本的な塩基配列を示した。上記プライマーは、いずれもその3'末端の2塩基がリボ核酸であるキメラオリゴヌクレオチドプライマーである。さらに、pUC19 upper (2) NNプライマーは、3'末端を鋳型と相補的なUおよびミスマッチのA、C、Gに置換した4種類（それぞれ、pUC19 upper (2) NN-U、pUC19 upper (2) NN-A、pUC19 upper (2) NN-CおよびpUC19 upper (2) NN-Gと称する）を作製した。これらのプライマーの組み合わせについて以下に示す。

【0125】

プライマー対1： pUC19 upper (2) NN-UおよびpUC19 lower NN
 プライマー対2： pUC19 upper (2) NN-AおよびpUC19 lower NN
 プライマー対3： pUC19 upper (2) NN-CおよびpUC19 lower NN
 プライマー対4： pUC19 upper (2) NN-GおよびpUC19 lower NN

【0126】

反応液は、下記のように調製した。

30 mM リン酸カリウムバッファー (pH 7.3)、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、5% DMSO、各 1 mM dNTP 混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ 60 pmol の上記のプライマー対および 50 ng の鋳型 DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を 48 μ l にした。

【0127】

上記反応液を 98℃、1 分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼ、60 U の E. coli RNase H を添加し、55℃、60 分間保持した。その後、90℃、2 分間加熱して酵素を失活させた。各反応液 8 μ l を使用し、4% ヌシーブ 3:1 アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。その結果、pUC19 upper (2) NN の 3' 末端が相補的なプライマーの組み合わせのみ目的とする約 450 bp の増幅断片が検出された。一方、pUC19 upper (2) NN の 3' 末端がミスマッチのプライマーの組み合わせについてはいずれも増幅断片は、確認できなかった。

【0128】

実施例 4

(1) エッペンドルフチューブでの反応

本発明の増幅方法について反応容量の検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。配列表の配列番号 12 および 13 記載の配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、3' 末端の 2 塩基がリボ核酸に置き換わったものを使用した。鋳型となる DNA は、あらかじめ RT-PCR 法により得た増幅断片約 750 bp を使用した。反応容量は、50 μ l、100 μ l、300 μ l、および 500 μ l になるように調製した。下記に反応液組成を示す。

反応液 A: 5×専用バッファー (135 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)、0.5 mg/ml BSA、2.5% DMSO) 10 μ l、100 mM 酢酸マグネシウム 4 μ l、10 mM dNTP 混合物 5 μ l、10 μ M ATP

10 μ l、BcaBEST DNAポリメラーゼ (22 U/ μ l) 1 μ l、R Nase H (60 U/ μ l) 1 μ l、および滅菌蒸留水で39 μ lに調製した。

反応液B：20 μ MヒトトランスフェリンレセプターSプライマー (配列番号12) および20 μ Mヒトトランスフェリンレセプタープライマー (配列番号13) をそれぞれ3 μ l、鋳型DNA約100 ngおよび滅菌蒸留水で11 μ lにした。容量が50 μ l以上の場合は、上記組成に基づきスケールアップした。

【0129】

増幅反応は、上記B液を98℃、2分間処理した後、55℃、3分間保持した。次に、55℃でプレインキュベーションしたA液に前述のB液を添加し、混和後、55℃で1時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液8 μ lを3%アガロースゲル電気泳動した。

【0130】

その結果、いずれの反応容量においても効率よく目的とする約300 bpの増幅断片が検出できた。また、鋳型DNAがPCR増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。

【0131】

(2) シャーレでの反応

反応容量の増大に伴う反応液の温度不均一を防ぐために、シャーレを使用して検討を行った。増幅領域としては、ヒトトランスフェリンレセプターをコードする領域を選択した。配列表の配列番号12および13記載の配列を有するプライマーを使用した。なお、該プライマーは、3'末端の2塩基がリボ核酸に置き換わったものを使用した。鋳型となるDNAは、あらかじめRT-PCR法により得た増幅断片約750 bpを使用した。反応容量は、10 mlになるように調製した。下記に反応液組成を示す。

反応液A：5×専用バッファー (135 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.5)、0.5 mg/ml BSA、2.5% DMSO) 2000 μ l、10 mM 酢酸マグネシウム 800 μ l、10 mM dNTP混合物 1000 μ l および滅菌蒸留水で9.1 mlに調製した。

反応液B：60 μ M ヒトトランスフェリンレセプターSプライマー (配列番

号 12) および 60 μ M ヒトトランスフェリンレセプタープライマー (配列番号 13) をそれぞれ 200 μ l、鋳型 DNA 約 10 μ g および滅菌蒸留水で 500 μ l にした。

反応液 C: BcaBEST DNA ポリメラーゼ (22 U/ μ l) 200 μ l、RNase H (60 U/ μ l) 200 μ l

【0132】

増幅反応は、上記 B 液を 98℃、1 分間処理した後、55℃、3 分間保持した。次に、55℃でプレインキュベーションした A 液に前述の B 液を添加し、さらに C 液を添加し混和後、55℃で 1 時間インキュベーションした。反応終了後、氷浴上に移し、反応液 8 μ l を 3% アガロースゲル電気泳動した。

【0133】

その結果、10 ml の反応容量であっても目的とする約 300 bp の増幅断片が効率よく検出できた。また、鋳型 DNA が PCR 増幅断片であっても問題なく目的とする増幅断片を得られることを確認した。即ち、多量の DNA 断片を必要とする DNA チップ作製において、本発明の方法が従来の PCR 法と比較しても好適に使用できることを確認した。

【0134】

実施例 5

(1) バッファの種類と RNase H 使用量の関係

バッファの種類と RNase H の使用量の関係について検討した。鋳型として pUC19 ベクターに 249 bp および 911 bp のフラグメントをクローニングして得られたプラスミド DNA (pUC19-249 および pUC19-911 と称す) を、プライマーとして配列表の配列番号 16~17 記載の配列を有する MF2N3 (24) プライマーおよび MR1N3 (24) プライマーの 3' 末端 3 塩基をリボヌクレオチドにしたキメラオリゴヌクレオチドプライマーを使用した。該プライマーの組み合わせにより pUC19-249 では約 450 bp の、pUC19-911 では約 1100 bp の増幅断片が得られる。

【0135】

検討するバッファは、トリス塩酸バッファ、リン酸カリウムバッファ、

トリシンバッファー系を選択した。また、RNase Hは、無添加および最終濃度0.3 U \sim 1.2 U/ μ lで検討した。トリス塩酸バッファー系は、10 ngのpUC19-249あるいは200 ngのpUC19-911、各60 pmolのプライマーおよび11 U/50 μ l 反応容量のBcaBEST DNAポリメラーゼ以外は、実施例1(2)と同様に組成した。リン酸カリウムバッファー系についても同様の組成とした。トリシンバッファー系については、最終濃度が34 mM トリシンバッファー(pH 8.7)、10 mM 塩化カリウム、10 mM 硫酸アンモニウム、0.01% BSA、1% DMSO、4 mM 酢酸マグネシウム、0.5 mM dNTP混合物となるように組成した。上記バッファー系についてpUC19-249プラスミド10 ng/50 μ l 反応容量、ならびにpUC19-911プラスミド200 ng/50 μ l 反応容量、各60 pmol/50 μ l 反応容量のプライマー、各濃度となるRNase H、11 U/50 μ l 反応容量のBcaBEST DNAポリメラーゼになるように調製した。

【0136】

増幅反応は鋳型となるpUC19-249あるいはpUC19-911と各プライマーの混液を98 $^{\circ}$ Cで1分間熱変性処理後、55 $^{\circ}$ Cまで冷却した後に残りの反応組成混液を添加し、55 $^{\circ}$ Cで60分間反応させた。反応終了後、4 $^{\circ}$ Cに冷却し、1/10量の0.5 M EDTAを添加して反応を停止させた。その後、各反応液の3 μ lを3%ヌシーブ3:1アガロース(宝酒造社製)ゲルにて電気泳動を行った。

【0137】

その結果、pUC19-249を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、リン酸カリウムバッファー系、トリシンバッファー系の順に、pUC19-911を鋳型とした場合はトリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系、リン酸カリウムバッファー系の順に増幅効率の向上が認められた。さらに、RNase Hについては、無添加では目的の増幅断片は得られなかったが、最終濃度0.3 U \sim 1.2 U/ μ lで用いた場合はいずれも目的の増幅断片が得られた。

【0138】

(2) プライマー量の検討

使用するプライマー量が本発明の増幅方法に与える影響を検討した。反応液は、上記(1)記載の組成のうち、鋳型として pUC19-249 を用いた系を使い、リン酸カリウムバッファー系は 60 U / 50 μ l 反応の RNase H を、トリス塩酸バッファー系、トリシンバッファー系は 30 U / 50 μ l 反応の RNase H を用いて行った。プライマーの濃度は 10 pmol ~ 100 pmol / 50 μ l の範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記(1)記載と同様にした。

【0139】

その結果、どの反応バッファー系を用いた場合も、10 pmol ~ 100 pmol / 50 μ l の範囲で目的とする増幅断片が確認できた。

【0140】

(3) 反応バッファーの pH の影響

反応液の pH が本発明の増幅方法に与える影響について検討した。反応液は、上記(2)記載の組成と同様にした。pH は、リン酸カリウムバッファー系は、pH 7.0 ~ 8.0 の範囲で、トリシンバッファー系は、pH 7.5 ~ 9.2 の範囲で、トリス塩酸バッファー系は、pH 7.5 ~ 9.0 の範囲で検討した。反応条件および増幅確認は、上記(1)記載と同様にした。

【0141】

その結果、各々のバッファー系で用いた pH の範囲において、目的とする増幅断片が確認できた。

【0142】

(4) 添加剤の効果

上記(3)記載のリン酸バッファー系 (pH 7.5) の反応液組成で、ジメチルスルオキシド (DMSO) の添加効果を検討した。また、ポリアミンの添加効果についても検討した。DMSO の添加量は、無添加 ~ 10% の範囲で検討した。一方、ポリアミンとしては、スペルミン 4 塩酸塩 (シグマ社製)、スペルミジン 3 塩酸塩 (シグマ社製)、アセチルプトレスシン (ナカライ社製)、プトレスシン 2 塩酸塩 (ナカライ社製)、トリメチレンジアミン (ナカライ社製)、プロピ

レンジアミン（ナカライ社製）、ジアミノメタン 2 塩酸塩（ナカライ社製）を使用した。添加量は、プロピレンジアミンおよびトリメチレンジアミンは、無添加～2%の範囲で、それ以外のポリアミンは、無添加～5 mMの範囲で行った。反応条件および増幅確認は、上記（1）記載の方法と同様にした。

【0143】

その結果、DMSOは、無添加～5%、スペルミン 4 塩酸塩とスペルミジンは、無添加～200 μ M、アセチルプトレスシンとプトレスシン 2 塩酸塩は、40 μ M～40 mM、トリメチレンジアミンは、0.002%～0.02%、プロピレンジアミンは、0.0001%～0.01%、そしてジアミノメタン 2 塩酸塩は、0.1 μ M～10 μ Mの範囲で、目的のDNA断片が効率よく増幅されることが確認できた。

【0144】

（5）マグネシウム塩の種類の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム塩の種類について検討した。鋳型として pUC19 DNAを、プライマーとして配列表の配列番号 11 および 6 記載の配列を有する pUC19 upper NN249 プライマーおよび pUC19 lower NN プライマーを使用した。該プライマー対で、約 225 bp の増幅断片が得られる。マグネシウム塩は、塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムおよび硫酸マグネシウムを使用した。以下に反応液組成を示す。

35 mM リン酸カリウムバッファー（pH 7.3）、最終濃度 8 mM の塩化マグネシウム、酢酸マグネシウムまたは硫酸マグネシウム、最終濃度 1.0 mM dNTP 混合物、50 ng pUC19 DNA、各 60 pmol の上記プライマー対、60 U RNase H、5.5 U BcaBEST DNA ポリメラーゼ、および滅菌蒸留水で反応容量 50 μ l。反応条件および増幅確認は、上記（3）と同様にして行った。

【0145】

その結果、いずれのマグネシウム塩においても目的の増幅断片が確認できた。

【0146】

（6）マグネシウム濃度、および dNTP 濃度の検討

本発明の増幅方法に対するマグネシウム濃度、および dNTP 濃度について検討した。反応液組成は、25 ng の pUC19 DNA、種々の濃度のマグネシウム、dNTP 以外は上記（５）記載のものと同様にした。反応条件および増幅確認は上記（１）と同様にして行った。

【0147】

最終濃度 1 mM の dNTP で固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃度 6 mM ～ 10 mM の範囲で目的の増幅断片が得られ、また、最終濃度 8 mM のマグネシウムで固定した反応系では dNTP 濃度が最終濃度 0.6 ～ 1.2 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。さらに、最終濃度 0.5 mM の dNTP で固定した反応系では、マグネシウム濃度が最終濃度 2 mM ～ 6 mM の範囲で目的の増幅断片が得られ、最終濃度 4 mM のマグネシウムで固定した反応系では dNTP 濃度が最終濃度 0.2 ～ 0.8 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。

【0148】

（７）リン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度変化と反応性の検討

本発明の増幅方法に対するリン酸カリウムバッファー濃度、およびトリシンバッファー濃度について検討した。反応液組成は、最終濃度 20 ～ 50 mM リン酸カリウムバッファー、最終濃度 22 ～ 46 mM トリシンバッファーとする以外は上記（１）記載の pUC19-249 を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記（１）と同様にして行った。

【0149】

その結果、リン酸カリウムバッファー、トリシンバッファーの濃度が、それぞれ最終濃度 20 ～ 50 mM、最終濃度 22 ～ 46 mM の範囲で目的の増幅断片が得られた。

【0150】

（８）BcaBEST DNA ポリメラーゼ濃度の検討

本発明の増幅方法に対する BcaBEST DNA ポリメラーゼ濃度について検討した。反応液組成はリン酸カリウムバッファー、トリシンバッファー系を用い、BcaBEST DNA ポリメラーゼを 1 ～ 22 U / 50 μ l 反応容量の範囲

で使用する以外は上記(1)記載の pUC19-249 を鋳型とした反応と同様にした。反応条件および増幅確認も上記(1)と同様にして行った。

【0151】

その結果、BcaBEST DNAポリメラーゼ量が1~22U/50 μ lの範囲において目的の増幅断片が得られた。

【0152】

実施例 6

PCR法との比較

本発明の増幅方法についてPCR法との比較を行った。鋳型は、pUC19プラスミドDNAのマルチクローニングサイトに約150bpおよび約250bpのDNA断片を挿入したものをを用いた。該鋳型は、以下のようにして調製した。

配列表の配列番号10、11および6記載の配列を有するpUC19 upper 150プライマー、pUC19 upper 249プライマー、pUC19 lower NNプライマー、を使用し、pUC19プラスミドDNA100pgを鋳型としてPCR反応を行った。pUC19 upper 150プライマーおよびpUC19 lower NNプライマーの組み合わせでは約150bpの増幅断片、pUC19 upper 249プライマーおよびpUC19 lower NNプライマーの組み合わせでは、約250bpの増幅断片が得られた。該増幅断片は、マイクロコン-100で精製後、DNA blunting kit (宝酒造社製)を用いて平滑末端化し、pUC19プラスミドのHincIIサイトにサブクローニングした。上記増幅断片の挿入されたプラスミドを用いて、大腸菌JM109を形質転換した。該形質転換体を培養し、その菌体よりQIAGEN plasmid mini kitを用いてDNA挿入プラスミドを精製した。このDNA挿入プラスミドを鋳型として使用した。

【0153】

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号18~19に示した。なお、本発明の増幅方法に用いるプライマーは、3'末端3塩基がリボヌクレオチドに置換したものをを使用した。以下に反応液組成を示す。

【0154】

27 mMリン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、5% DMSO、各1 mM dNTP混合物、8 mM酢酸マグネシウム、それぞれ60 pmolの上記のプライマー対および1 ngの鋳型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を48 μ lにした。

【0155】

上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、60 UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液3 μ lを4% ヌシーブ3:1アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。

【0156】

一方、対照としてPCR法での増幅を行った。反応は、PCR Amplification kit (宝酒造社製) を使用し、配列表の配列番号18~19に示したリボヌクレオチドを含まないプライマーを各10 pmolずつ、1 ngの鋳型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を50 μ lにした。反応条件は、94℃ 30秒、55℃ 30秒、72℃ 40秒を1サイクルとして25サイクル行った。反応終了後、各反応液3 μ lを4% ヌシーブ3:1アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。

【0157】

その結果、挿入断片が、150 bpおよび249 bpのいずれのプラスミドを鋳型とした場合においてもPCR法より本発明の増幅方法の方が目的の増幅断片が多く確認できた。さらに増幅産物量を数値化するために、上記各反応液20 μ lをマイクロコンー100にて精製し、その量をベックマンDU-640分光光度計 (ベックマン社製) にて定量した。すると本発明の増幅方法の方が挿入断片が150 bpのプラスミドを鋳型とした場合は約60倍、挿入断片が250 bpの場合は約40倍多く得られることが確認できた。このことから、多量のDNA断片を必要とするDNAチップにおいて、本発明の方法が従来のPCR法と比較しても好適に使用できることを確認した。

【0158】

実施例 7

(1) RNAプロブの調製

本発明の増幅方法により得られた増幅断片の検出法について検討した。検出用プロブとして、リボヌクレオチドで構成され、該両端に異なる2つの蛍光物質の結合したものを調製した。検出用RNAプロブは、DNA合成機（アプライド・バイオシステム社製）を用いて合成した。その塩基配列を配列表の配列番号20に示す。また、蛍光標識は、5'末端側が、6-FAM（グリーンリサーチ社製）、3'末端側が、TAMRA（グリーンリサーチ社製）を使用した。

【0159】

(2) 増幅反応および検出

鋳型として、0.1および1 ngのpUC19 DNAを使用した。プライマーは、配列表の配列番号10および8に記載の配列を有するpUC19 upper 150プライマーおよびpUC19 lower 542プライマーで、該プライマーの3'末端2塩基が、リボヌクレオチドに置き換わったものを使用した。

【0160】

反応液組成を以下に示す。

27 mMリン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA、5% DMSO、各1 mM dNTP混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ60 pmolの上記のプライマー対および0.1または1 ngの鋳型DNA、上記RNAプロブ0.1 μ gおよび滅菌蒸留水で反応液容量を48 μ lにした。また対照として、鋳型DNAなしのものも調製した。

【0161】

上記反応液を98℃、1分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、22 UのBcaBEST DNAポリメラーゼまたは滅菌水、および60 UのE. coli RNase Hを添加し、55℃、60分間保持した。その後、10% SDS（ドデシル硫酸ナトリウム、ナカライ社製）を5 μ l添加し、酵素を失活させた。各反応液50 μ lを滅菌水で等量希釈し、マイクロプレートに移した。検出は、イメージアナライザーFM BIO II Multi-View（宝酒造社製

) を用いて励起波長 505 nm で行った。

【0162】

その結果、BcaBEST DNAポリメラーゼ無添加では、どの鑄型量でも蛍光シグナルは検出されなかった。また、BcaBEST DNAポリメラーゼ添加時においても鑄型DNA量がなしの場合も蛍光シグナルは検出されなかった。一方、鑄型DNAが0.1 ngあるいは1 ngの場合、いずれも蛍光シグナルを検出することができた。また、同時に0.00003%のエチジウムブロマイドを含む3%アガロース電気泳動においてもBcaBEST DNAポリメラーゼ存在下、鑄型DNA量が0.1 ngおよび1 ngの場合のみ目的とする約190 bpの増幅断片が確認できた。即ち、RNAプローブによる検出法と従来の電気泳動による検出法において同じ結果が得られた。このように、本発明の増幅方法で得られた増幅断片をRNAプローブを用いて検出する方法を確立した。

【0163】

実施例 8

本発明の方法で一方のプライマーをデオキシヌクレオチドにした場合について検討した。プライマーは、配列表の配列番号19記載の配列を有するMR1N3(30)とM4プライマー(宝酒造社製)を使用した。なお、MR1N3プライマーは、3'末端3塩基がリボヌクレオチドに置換したものをを使用した。以下に反応液組成を示す。

【0164】

27 mM リン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、5% DMSO、各1 mM dNTP混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ30 pmolの上記のプライマー対および1 ngの鑄型DNA、および滅菌蒸留水で反応液容量を24 μ lにした。

【0165】

上記反応液を98℃、2分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、11 UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、30 UのE. coli RNase Hを添加し、反応容量を25 μ lにした。該反応液を55℃、60分間保持した。その後、90℃、2分間加熱して酵素を失活させた。各反応液5 μ lを4% ヌシ

ープ 3 : 1 アガロースゲルにて電気泳動を行なった。その結果、目的の増幅断片が確認できた。

【0166】

実施例 9

本発明の方法を用いて出血性大腸菌 O-157 検出を行った。

本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号 21 ~ 24 に示した。配列番号 21 と 22 の組み合わせは、O-157 のベロ毒素 1 をコードする配列を、配列番号 23 と 24 の組み合わせは、ベロ毒素 2 をコードする配列を検出するようにプライマーを構築した。なお、本発明の増幅方法に用いるプライマーは、3' 末端 3 塩基がリボヌクレオチドに置換したものを使用した。鋳型は、出血性大腸菌 O-157 を培養したものを集菌し、適当な細胞数に滅菌水で懸濁した後、98℃で 10 分間処理した熱抽出物を使用した。以下に反応液組成を示す。

【0167】

27 mM リン酸バッファー (pH 7.3)、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、5% DMSO、各 1 mM dNTP 混合物、8 mM 酢酸マグネシウム、それぞれ 60 pmol の上記のプライマー対、 $10^4 \sim 10^6$ 細胞数に相当する鋳型 DNA (熱抽出物)、および滅菌蒸留水で反応液容量を 48 μ l にした。

【0168】

上記反応液を 98℃、1 分間熱変性処理後、55℃に冷却した。次に、5.5 U の BcaBEST DNA ポリメラーゼ、60 U の E. coli RNase H を添加し、55℃、60 分間保持した。その後、90℃、2 分間加熱して酵素を失活させた。各反応液 3 μ l を 4% ヌシーブ 3 : 1 アガロース (宝酒造社製) ゲルにて電気泳動を行なった。

【0169】

その結果、いずれのプライマー対でも 10^4 細胞数相当の DNA を鋳型として、O-157 ベロ毒素 1 および 2 を検出することができ、本発明の方法が、病毒性細菌の検出方法として利用できることを確認した。

【0170】

実施例 10

本発明の方法による長鎖DNA断片の増幅について検討した。鋳型となる2本鎖DNAは、以下のようにして調製した。まず、胃正常部組織由来mRNAから常法によりUni-ZAP XRベクター（ストラタジーン社製）を用いてライブラリーを構築した。次にそのライブラリーをスクリーニングして、インサート部が約2.1 kbpおよび約4.3 kbpのクローンを用いてインビトロエキサクションして得られたpBluescript SK（-）ファージベクターを選択した。さらに、該プラスミドを鋳型として、配列表の配列番号25～26記載の配列を有するMCR-FプライマーおよびMCR-Rプライマー、PCR Amplification Kit（宝酒造社製）を用いて約2.2 kbpおよび約4.4 kbpの増幅断片を得た。このPCR断片を本発明の増幅方法の鋳型とした。使用するプライマーは、配列表の配列番号27～28に記載の配列を有するMF2N3（24）プライマーおよびMR1N3（24）プライマーを使用し、該プライマーは3'末端の3塩基がリボヌクレオチドである。反応液組成を以下に示す。

【0171】

28 mM リン酸バッファー（pH 7.5）、0.01% BSA（牛血清アルブミン）、1% DMSO、各0.5 mM dNTP混合物、4 mM 酢酸マグネシウム、各30 pmolの上記のプライマー対、0.2 mM プトレスシンおよび滅菌水を加え、24.25 μ lにした。該反応液を92℃で2分間処理して、55℃に冷却した後、30 UのRNase Hおよび5.5 UのBcaBEST DNAポリメラーゼを加え、反応容量を25 μ lにし、1時間保持した。反応終了後、4℃に冷却し、0.5 M EDTA溶液を2.5 μ l加えて反応を停止させた。その後、該溶液5 μ lを1%アガロース電気泳動に供した。

【0172】

その結果、本発明の方法で約2.2 kbpあるいは約4.4 kbpの増幅断片を得ることができ、本方法で長鎖DNA断片を増幅できることを確認した。

【0173】

実施例 11

本発明の増幅方法で増幅した約400bpのλDNA断片とPCRで増幅した300bpと1000bpのλDNA断片をスポットしたDNAマイクロアレイを作製した。本実施例において使用するプライマーを配列表の配列番号25～26および29～35に示した。なお、本発明の増幅方法の反応液は、下記のように調製した。

34mM トリシン塩酸バッファー (pH 8.7)、10mM塩化カリウム、10mM硫酸アンモニウム、0.01% BSA (牛血清アルブミン)、1% ジメチルスルオキシド、4mM酢酸マグネシウム、各0.5mM dNTP混合物、それぞれ500pmolのプライマー対、ならびに鋳型として100ngのPCR増幅産物、110UのBcaBEST DNAポリメラーゼ、300UのclonedRNaseH、反応液の最終容量は500μl。上記反応液を均一に混合し、55℃で60分間保温した後、90℃で2分間加熱して酵素を失活させた。この溶液を以下の工程に使用した。また、スポットしたDNA断片は次の通りである。

【0174】

1. サンプル：λDNAを鋳型にした、配列表の配列番号29と30に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによるPCR増幅産物(300bp)をpUC19ベクターにサブクロニング後、配列表の配列番号25と26に記載の配列を有するプライマーでPCR増幅したものを鋳型にして、配列表の配列番号31と32に記載の配列を有するプライマーで、該プライマーの3'末端2塩基がリボヌクレオチドであるキメラオリゴヌクレオチドプライマーで本発明の増幅方法により増幅したもの(増幅サイズは約400bp)。スポットする際のDNA溶液としては、反応液原液、炭酸バッファーでそれぞれ2倍、4倍、8倍、16倍希釈したもの(希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて50mM)で計5種類。

2. サンプル：上記1で増幅したDNA断片をマイクロコン100(宝酒造社製)で処理して50mM 炭酸バッファーで次の0.125μg/μl, 0.25μg/μl, 0.5μg/μl, 1.0μg/μl, 2.0μg/μlの各濃度に調整したもの、計5種類。

3. 陽性コントロール: λ DNA を鋳型にした、配列表の配列番号 29 と 30 に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによる PCR 増幅産物 (300 bp) をマイクロコン 100 で処理して 50 mM 炭酸バッファーで次の 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計 5 種類。

4. 陽性コントロール: λ DNA を鋳型にした、配列表の配列番号 33 と 34 に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによる PCR 増幅産物 (1000 bp) をマイクロコン 100 で処理して 50 mM 炭酸バッファーで次の 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計 4 種類。

5. 陰性コントロール: λ DNA を鋳型にした、配列表の配列番号 33 と 35 に記載の配列を有するプライマーの組み合わせによる PCR 増幅産物 (300 bp) を pUC19 ベクターにサブクローニング後、配列表の配列番号 25 と 26 に記載の配列を有するプライマーで PCR 増幅したものを鋳型にして、配列表の配列番号 31 と 32 に記載の配列を有するプライマーで本発明の増幅方法により増幅したもの (増幅サイズは約 400 bp)。スポットする際の DNA 溶液としては、反応液原液、炭酸バッファーでそれぞれ 2 倍、4 倍、8 倍、16 倍希釈したもの (希釈溶液の炭酸バッファー濃度はすべて 50 mM) で計 5 種類。

6. 陰性コントロール: 上記 5 で得られた DNA 断片をマイクロコン 100 で処理して 50 mM 炭酸バッファーで次の 0.125 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.25 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 0.5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 1.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$, 2.0 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ の各濃度に調整したもの、計 5 種類。

【0175】

調製した各 DNA 溶液を DNA チップ作製装置 (Genetic Microsystems: GMS 社製) を用いてアミノ基導入スライドガラス (松浪硝子工業社製) にスポットし、UV 照射により固定した。スライドを 0.2% SDS、次いで蒸留水で洗浄、乾燥して DNA アレイとした。

【0176】

また、配列表の配列番号 29 と 30 に記載の配列を有するプライマーの組み合

わせによるPCR増幅産物(300bp)をLabel IT Cy5^R Labeling Kit(宝酒造社製)によりCy5標識してプローブとした。次に、IntelliGene(宝酒造社製)の取扱説明書に記載のプレハイブリダイゼーション溶液およびハイブリダイゼーション溶液を用いてハイブリダイゼーションを行った。まず上記DNAアレイを室温にて2時間プレハイブリダイゼーション処理を行った後、変性したCy5標識プローブを含むハイブリダイゼーション溶液をDNAアレイに滴下し、カバーガラスをかけて周囲をフィルムで密封した。これを65℃で13時間保持した後、カバーガラスを除いて、65℃で2×SSC溶液で5分間、次に65℃で0.2×SSCおよび0.1%SDSを含む溶液で5分間、最後に室温で0.2×SSC溶液で5分間洗浄し、風乾した。これをマイクロアレイスキャナー(GMS社)にかけて各スポットの蛍光シグナルを解析した。

【0177】

この結果、PCR法で増幅した断片(上記3、4の陽性コントロール)および、本発明の方法で増幅した断片(上記1、2のサンプル)をスポットした位置のいずれにおいても蛍光シグナルが確認できた。また、シグナルの強さはサンプル2>陽性コントロール4>サンプル1>陽性コントロール3であった。一方、陰性コントロールの5、6ではシグナルは全く認められなかった。このことから、本発明の方法で増幅したDNA断片は、未精製でもあるいは精製後でもDNAチップを作製するための固定化用DNA断片として好適に使用できることを確認した。

【0178】

【発明の効果】

本発明により、キメラオリゴヌクレオチドプライマーの存在下にDNA合成反応を行なうことを特徴とする簡便で、効率の良い核酸配列の増幅方法が提供される。

【0179】

配列表フリーテキスト

SEQ ID NO:1

Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template

SEQ ID NO:2

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:3

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:4

Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified po rtion of human transferrin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:5

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to ampl ify a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:6

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplif y a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:7

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUSEQ ID NO:8

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower 542 to ampli fy a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:9

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19 SEQ ID NO:10

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to ampli fy a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:11

Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to ampli

fy a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:12

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer
rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:13

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer
rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:14

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer
rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:15

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transfer
rin receptor-encoding sequence

SEQ ID NO:16

Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a p
ortion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

SEQ ID NO:17

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a p
ortion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

SEQ ID NO:18

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

SEQ ID NO:19

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a porti
on of plasmid pUC19

SEQ ID NO:20

Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of pl
asmid pUC19

SEQ ID NO:21

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-e

ncoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

SEQ ID NO:22

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

SEQ ID NO:23

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

SEQ ID NO:24

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

SEQ ID NO:25

Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:26

Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:27

Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:28

Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify a long DNA fragment

SEQ ID NO:29

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID NO:30

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

SEQ ID NO:31

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage
lambda DNA

SEQ ID NO:32

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage
lambda DNA

SEQ ID NO:33

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage
lambda DNA

SEQ ID NO:34

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage
lambda DNA

SEQ ID NO:35

Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage
lambda DNA

【 0 1 8 0 】

【配列表】

SEQUENCE LISTING

<110> Takara Shuzo Co., Ltd.

<120> A method for amplification of nucleotide sequence

<130> 169297

<160> 35

<210> 1

<211> 99

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic DNA corresponding to a portion of human transferrin receptor-encoding sequence used as a template

<400> 1

ggacagcaac tgggccagca aagttgagaa actcacttta gagaattctg ctttccttt 60
ccttgcatat tctgagcagt ttctttctgt ttttgcgag 99

<210> 2

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 2

cagcaactgg gccagcaaag tt 22

<210> 3

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human tran

sferrin receptor-encoding sequence

<400> 3

gcaaaaacag aaagaaactg ct

22

<210> 4

<211> 26

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide used as a probe for detecting an amplified portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 4

tgctttccct ttccttgcat attctg

26

<210> 5

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper(2)NN to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 5

attgcttaat cagtgaggca cctat

25

<210> 6

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower NN to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 6

gataacactg cggccaactt acttc

25

<210> 7

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 7

actggcgaac tacttactct agctt

25

<210> 8

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 lower 542 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 8

agtcaccagaa aagcatctta cggat

25

<210> 9

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 9

gctcatgaga caataaccct gataa

25

<210> 10

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 150 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 10

ggtgtcacgc tcgtcgtttg gtatg

25

<210> 11

<211> 25

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as pUC19 upper 249 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 11

cgcctccatc cagtctatta attgt

25

<210> 12

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 12

ctgattgaga ggattcctga gt

22

<210> 13

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 13

tagggagaga ggaagtgata ct

22

<210> 14

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 14

caacttcaag gtttctgcca gc

22

<210> 15

<211> 21

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of human transferrin receptor-encoding sequence

<400> 15

aatagtccaa gtagctagag c

21

<210> 16

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify
a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

<400> 16

gctgcaaggc gattaagttg ggta

24

<210> 17

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify
a portion of plasmid pUC19-249 or plasmid pUC19-911

<400> 17

ctttatgctt ccggctcgta tggt

24

<210> 18

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 18

ggatgtgctg caaggcgatt aagttgggta 30

<210> 19

<211> 30

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3 to amplify a portion of plasmid pUC19

<400> 19

tttacacttt atgcttccgg ctcgtatgtt 30

<210> 20

<211> 30

<212> RNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthetic RNA used as a probe for detecting an amplified portion of plasmid pUC19

<400> 20

ugauc(cccca uguugugcaa aaaagcgguu

30

<210> 21

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

<400> 21

tgtcattcgc tctgcaatag gta

23

<210> 22

<211> 23

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin 1-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

<400> 22

caccagacaa tgtaaccgct gtt

23

<210> 23

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

<400> 23

tactgggttt ttcttcgta

20

<210> 24

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of vero toxin
2-encoding sequence from hemorrhagic Escherichia coli 0-157

<400> 24

atagacatca agccctcgta

20

<210> 25

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-F to amplify a long DNA fragment

<400> 25

ccattcaggc tgcgcaactg tt

22

<210> 26

<211> 22

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MCR-R to amplify a long DNA fragment

<400> 26

tggcacgaca ggtttcccga ct

22

<210> 27

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MF2N3(24) to amplify a long DNA fragment

<400> 27

gctgcaaggc gattaagttg ggta

24

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer designated as MR1N3(24) to amplify
a long DNA fragment

<400> 28

ctttatgctt ccggctcgta tggt

24

<210> 29

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacterioph
age lambda DNA

<400> 29

aacaacaaga aactggtttc

20

<210> 30

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 30

gcaatgcatg acgactgggg

20

<210> 31

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 31

gttttcccag tcacgac

17

<210> 32

<211> 17

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

age lambda DNA

<400> 32

caggaaacag ctatgac

17

<210> 33

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 33

gtacggtcac catctgacac

20

<210> 34

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 34

gcaatcggca tggttaaagc

20

<210> 35

<211> 20

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Designed oligonucleotide primer to amplify a portion of bacteriophage lambda DNA

<400> 35

cgccatcctg ggaagactcc

20

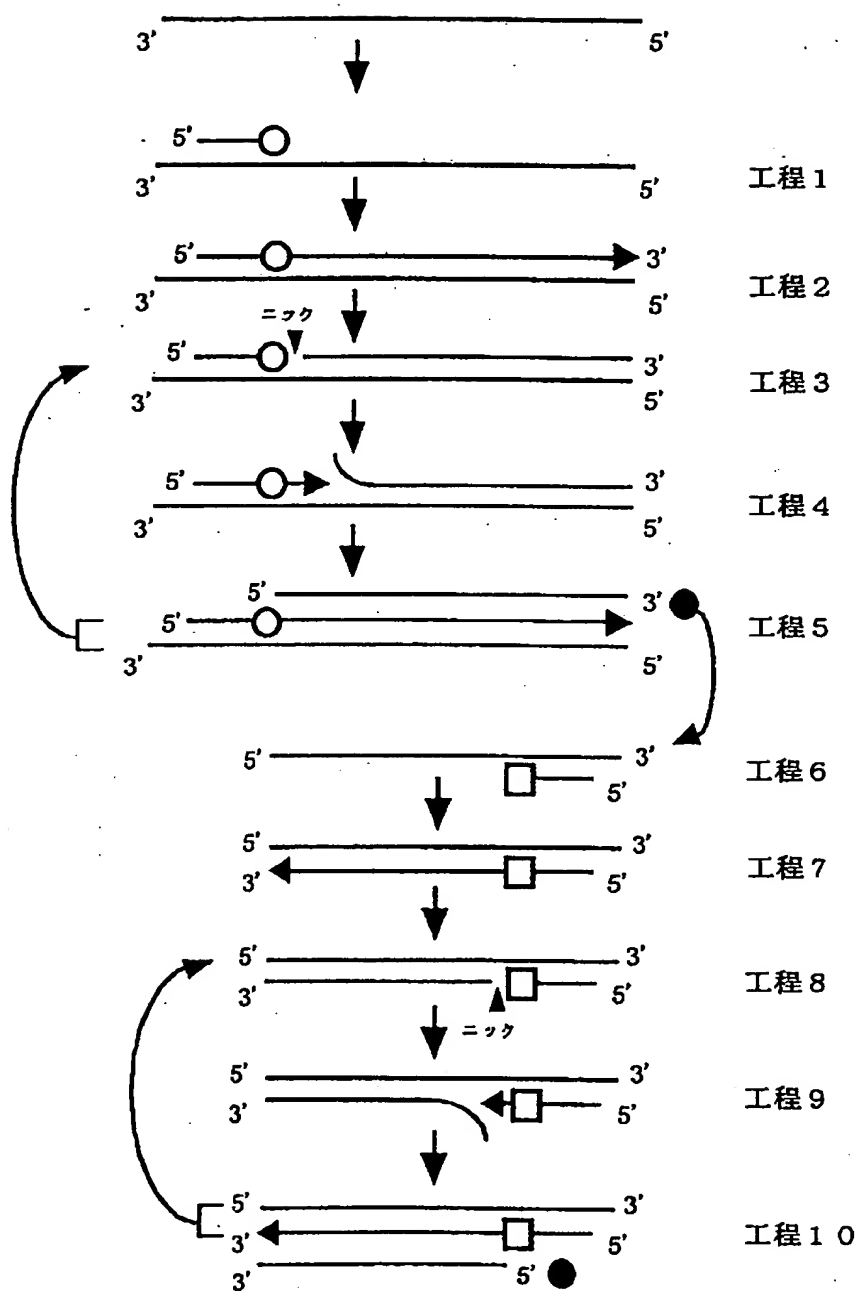
【図面の簡単な説明】

【図 1】 図 1 は、本発明における 1 本鎖 DNA に対する方法の一例を示すフローチャートである。

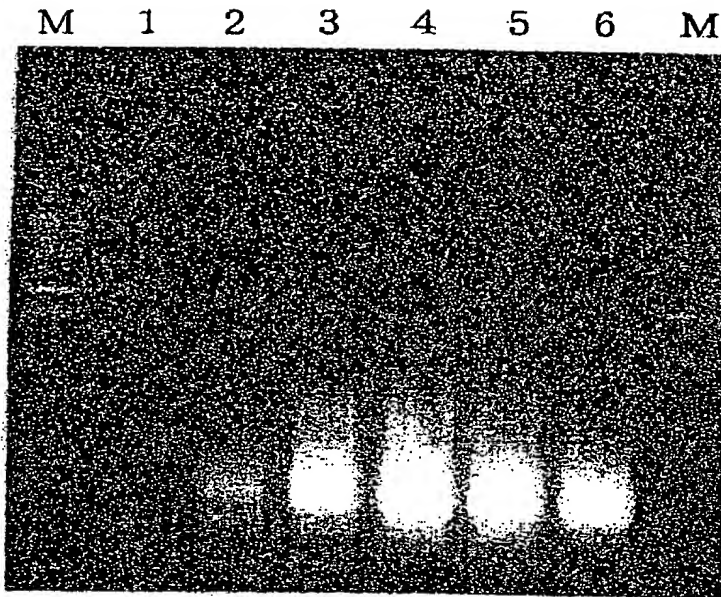
【図 2】 図 2 は、本発明の方法により種々の反応時間で増幅された増幅 DNA 断片の、アガロースゲル電気泳動の結果を示す図である。

【書類名】 図面

【図 1】



【図 2】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 オリゴヌクレオチドプライマーの存在下にDNA合成反応を行なうことを特徴とする簡便で効率の良い核酸配列の増幅方法を提供する。

【解決手段】 鋳型核酸を核酸塩基配列に実質的に相補的な少なくとも1種のプライマーとDNAポリメラーゼにより処理して鋳型に相補的なプライマー伸長鎖を合成する工程であり、該プライマーはデオキシリボヌクレオチドおよびリボヌクレオチドを含有するキメラオリゴヌクレオチドプライマーであり、リボヌクレオチドはエンドヌクレアーゼによる切断のためにプライマーの3'末端に配置される工程；上記工程で得られる二本鎖核酸のプライマー伸長鎖のリボヌクレオチド含有部位をエンドヌクレアーゼで切断する工程；上記工程で得られるプライマー伸長鎖が切断された二本鎖核酸のプライマー部分の3'末端より鎖置換活性を有するDNAポリメラーゼにより鋳型に相補的な核酸配列を伸長して鎖置換を行う工程を含む核酸配列の増幅方法。

【選択図】 なし

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号 [591038141]

1. 変更年月日 1991年 2月 4日

[変更理由] 新規登録

住 所 京都府京都市伏見区竹中町609番地
氏 名 寶酒造株式会社